

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



TESIS DOCTORAL

Análisis de la regulación de la glucoquinasa humana a partir del estudio de mutaciones asociadas a hipoglucemia y diabetes monogénica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen M^a García Herrero

Directora

M^a Ángeles Navas Hernández

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DE LA GLUCOQUINASA HUMANA
A PARTIR DEL ESTUDIO DE MUTACIONES ASOCIADAS A
HIPOGLUCEMIA Y DIABETES MONOGENICA**

TESIS DOCTORAL

CARMEN M^a GARCÍA HERRERO

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DE LA GLUCOQUINASA HUMANA
A PARTIR DEL ESTUDIO DE MUTACIONES ASOCIADAS A
HIPOGLUCEMIA Y DIABETES MONOGENICA**

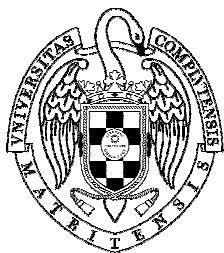
MEMORIA PRESENTADA POR

CARMEN M^a GARCÍA HERRERO

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

BAJO LA DIRECCIÓN DE

LA DRA. M^a ÁNGELES NAVAS HERNÁNDEZ



Dña. M^a ÁNGELES NAVAS HERNÁNDEZ, PROFESORA TITULAR del DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III de la FACULTAD DE MEDICINA de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la licenciada **Carmen M^a García Herrero** ha realizado el trabajo titulado: **“ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DE LA GLUCOQUINASA HUMANA A PARTIR DEL ESTUDIO DE MUTACIONES ASOCIADAS A HIPOGLUCEMIA Y DIABETES MONOGENICA”**, bajo mi dirección, en el DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III de la FACULTAD DE MEDICINA de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID para optar al grado de Doctor.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Madrid, a 23 de abril de 2012.

VºBº del Director

Fdo.: M^a Ángeles Navas Hernández

... Y llegado este momento, no quisiera dejar pasar la oportunidad de mirar al pasado y al presente y agradecer a todas las personas que han hecho posible que esté escribiendo estas líneas. A todos los que habéis aportado vuestro granito de arena durante este largo camino, GRACIAS.

En primer lugar, agradecer a la Dra. Ángeles Navas por su gran confianza en mí para la realización de este trabajo. Por haberme iniciado en el mundo de la investigación y poner sus conocimientos siempre a mi disposición. Por guiarme en cada momento hacia el camino correcto.

Al Dr. Enrique Blázquez por su continuo interés y ayuda a lo largo de estos años. Por su generosidad y cordialidad. Por proporcionarme toda la ayuda posible para mejorar mi formación científica.

Al Dr. Olivier Vincent por su gran ayuda en los ensayos de doble híbrido. Por acogerme en su grupo durante mis días en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A la Dra. Elvira Álvarez, Dra. Isabel Roncero, Dr. Juan Miguel Ruiz-Albusac, Dra. Esther Velázquez, Dr. José Antonio Zueco (...) por su apoyo durante estos años.

A todos los compañeros del Departamento con los que he compartido algún momento en todo este tiempo. A Mar (para mí siempre serás miss-mini), por tus notas al comienzo del día, porque nunca el llegar al laboratorio fue tan gratificante; Patri, gracias por tus palabras llenas de cariño y por ser la “culpable” del contacto CIB-Med; Pedro, nuestro “lab-manager”; María por ser mi predecesora y por ser la organizadora de “los eventos ociosos”; Alberto, por tu ayuda y por tu forma de ser; Cris, por tu gran apoyo, por nuestros momentos, ¡no cambies nunca!; Cristiana, Elena, al “equipo A” Ángel y Adrián por vuestra ayuda desinteresada, a las “chicas del fondo” Marta, Anita, Elena... por nuestras comidas y encuentros... A Sandra, por tu ayuda... A Antonio, por ser parte de “mi otro laboratorio” y por nuestras conversaciones en “la French”. A las “mamis” Inés y M^a Ángeles por hacerme más amenas mis horas en “la quinta”; a Miriam por tus cálidas visitas; a Onintza, porque nunca un saludo significó tanto, ¡no pierdas nunca ese espíritu!... En especial a Vero y a Carmen, por haber contribuido a hacer más llevadera esta etapa, por todos los buenos momentos. A Vero, por tu gran apoyo durante estos años. A Carmen por tu completa disponibilidad y tener siempre respuesta a mis “preguntitas”.

A quienes conocí en el punto de partida y a pesar de no seguir el mismo camino, seguimos en contacto y espero no perderlo nunca. En especial a Aurora y a Angélica, por nuestras charlas y porque todo llega. A Alexia, por tu cariño.

A mis amigos de siempre por ser precisamente eso... AMIGOS. Porque sin entender este mundo siempre habéis tenido una palabra de ánimo en el momento más necesario, inyectándome una dosis extra de positividad, por vuestra gran paciencia durante los últimos meses. Os doy las gracias por formar parte de mi vida y hacer que cada día me sienta más afortunada por sentirlos cerca. A Sheila, por recargarme siempre

las pilas, por tus consejos reconstituyentes, ¡no cambies nunca! A Juan, por tu gran apoyo incondicional durante tantos años. A David, por sacarme una sonrisa cuando más lo he necesitado y por nuestras tardes en busca del “oso verde”. A Ane (o mejor dicho, Dra. Garciandia), por ser como eres, por tu visión de la vida siempre con una sonrisa, por significar un grandísimo apoyo durante todo este tiempo, por tu gran confianza en mí y porque todo es posible. A Eva por haberte encontrado después de unos años y porque a partir de ahora las quedadas serán de tres. A Ana F., ¡qué gran descubrimiento fue conocerte!, por suponer un soplo de aire fresco, por entenderme, por tu gran ayuda durante estos últimos meses, por nuestros momentos de skype por el mundo, por confiar siempre en mí. A Marijose (mi Mjo), por ser como eres, por tus grandes consejos de psico-amiga. A mis amigas de la facultad, Marta, Lucía, Silvia, Begoña y Seila “sin h”, por nuestras “quedadas” y por todos los momentos inolvidables compartidos durante estos años.

A Antonio, Mariví, Bea, Casti y Alberto, por brindarme siempre vuestra mano amiga y vuestro apoyo. A Valeria, por hacerme valorar la importancia de una sonrisa y de los pequeños detalles.

A Javi, por cada momento...

A mis hermanos por vuestro gran apoyo incondicional. A mis padres, porque gracias a vosotros soy quien soy. Sin los valores de paciencia, sacrificio, respeto y responsabilidad que me habéis inculcado nada de esto habría sido posible. GRACIAS.

***“El éxito no se logra sólo con cualidades especiales.
Es sobre todo un trabajo de constancia, de método y
de organización”.***

J.P. Sergent

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	13
--------------------------	-----------

RESUMEN.....	17
---------------------	-----------

INTRODUCCIÓN

1. LA HOMEOSTASIS DE GLUCOSA. PAPEL DE LA GLUCOQUINASA.....	23
--	-----------

2. BIOQUIMICA Y ESTRUCTURA DE LA GLUCOQUINASA.....	27
---	-----------

2.1. COOPERATIVIDAD POR GLUCOSA: MODELOS CINÉTICO Y ESTRUCTURAL.....	29
--	----

3. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA.....	36
--	-----------

3.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.....	36
--------------------------------------	----

3.1.1. REGULACIÓN DEL PROMOTOR HEPÁTICO.....	37
--	----

3.1.2. REGULACIÓN DEL PROMOTOR NEUROENDOCRINO.....	38
--	----

3.2. REGULACIÓN POSTRANSKRIPCIONAL.....	38
---	----

3.2.1. ESTABILIZACIÓN POR GLUCOSA.....	38
--	----

3.2.2. MODIFICACIÓN COVALENTE: FOSFORILACIÓN,OXIDACIÓN Y NITROSILACIÓN...	38
---	----

3.2.3. REGULACIÓN ALOSTÉRICA.....	39
-----------------------------------	----

3.1. INTERACCIÓN DE LA GK CON OTRAS PROTEÍNAS: PAPEL EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.....	40
---	----

3.1.1. FOSFATASA DUAL GKAP/DUSP12.....	41
--	----

3.1.2. PRECURSOR DE LA SUBUNIDAD β DE LA PROPIONIL-CoA CARBOXILASA.....	41
---	----

3.1.3. ISOFORMA NEURONAL DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA.....	42
---	----

3.1.4. PENTAUBIQUITINA.....	42
-----------------------------	----

3.1.5. BAD.....	43
-----------------	----

3.1.6. 6-FOSFOFRUCTO-2-QUINASA-2,6-BISFOSFATASA.....	44
--	----

3.1.7. PROTEÍNA REGULADORA DE LA GLUCOQUINASA.....	46
--	----

4. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA.....	49
---	-----------

4.1. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA GLUCOQUINASA HEPÁTICA.....	50
---	----

4.2. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA GLUCOQUINASA EN LA CÉLULA β PANCREÁTICA.....	52
---	----

4.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA GLUCOQUINASA EN OTRAS CÉLULAS DEL EJE NEUROENDOCRINO.....	55
5. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA GLUCOQUINASA MUTADA.....	55
5.1. HIPOGLUCEMIA ASOCIADA A MUTACIONES EN EL GEN GCK: HIPERINSULINISMO CONGÉNITO (HI).....	55
5.2. HIPERGLUCEMIA ASOCIADA A MUTACIONES EN EL GEN GCK.....	57
5.2.1. DIABETES MELLITUS NEONATAL PERMANENTE (PNDM).....	57
5.2.2. HIPERGLUCEMIA FAMILIAR (MODY2).....	58
6. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS GLUCOQUINASAS MUTADAS.....	60
7. LA GLUCOQUINASA COMO DIANA PARA EL DESARROLLO DE NUEVAS TERAPIAS ANTIDIABÉTICAS.....	63

OBJETIVOS.....	67
-----------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	73
1.1. PLÁSMIDOS.....	73
1.2. MICROORGANISMOS.....	80
1.2.1. BACTERIAS COMPETENTES Y MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN.....	80
1.2.2. LEVADURA UTILIZADA EN EL ENSAYO DEL DOBLE HÍBRIDO, MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN Y VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.....	80
1.3. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	81
2. TÉCNICAS.....	81
2.1. TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	81
2.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN A LA GLUTATION-S-TRANSFERASA (GST).....	82
2.2.1. EXPRESIÓN.....	82
2.2.2. PURIFICACIÓN.....	82
2.2.3. DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN A GST EN GELES DE ACRILAMIDA...	83

2.3. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA.....	84
2.3.1. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA EN PRESENCIA DE INHIBIDORES COMPETITIVOS.....	85
2.3.1.1. N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA Y D-MANOHEPTULOSA.....	85
2.3.1.2. GKRP Y PALMITOIL-CoA.....	86
2.3.1.3. DETERMINACIÓN DE K_i	86
2.3.2. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA EN PRESENCIA DE LY2121260 O DE ISONIACIDA.....	87
2.3.2.1. DETERMINACIÓN DE EC_{50}	87
2.4. ENSAYO DE TERMOESTABILIDAD.....	87
2.5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA <i>IN VITRO</i>	88
2.5.1. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS <i>IN VITRO</i>	88
2.5.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST-GK PARA ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA (<i>PULL DOWN</i>) <i>IN VITRO</i>	88
2.5.3. ENSAYOS DE <i>PULL DOWN IN VITRO</i>	89
2.6. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFEROS EN CULTIVO.....	90
2.7. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.....	91
2.8. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.....	91
2.9. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i>	92
2.10. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES MEDIANTE MICROSCOPIA.....	93
3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	93
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	94

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUTACIONES OBJETO DE ESTUDIO.....	97
2. LOCALIZACIÓN DE LOS RESIDUOS AFECTADOS EN EL MODELO ESTRUCTURAL Y CONSERVACIÓN EN OTRAS GLUCOQUINASAS Y HEXOQUINASAS.....	100
3. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST-GK SILVESTRE Y MUTANTES.....	104

4. ANÁLISIS CINÉTICO DE LAS GLUCOQUINASAS RECOMBINANTES PURIFICADAS.	106
4.1. ANÁLISIS CINÉTICO DE MUTACIONES LOCALIZADAS PRÓXIMAS AL CENTRO ACTIVO.....	107
4.2. ANÁLISIS CINÉTICO DE MUTACIONES LOCALIZADAS EN RESIDUOS PERIFÉRICOS....	110
4.2.1. EFECTO DE LOS INHIBIDORES COMPETITIVOS N-ACETILGLUCOSAMINA Y D-MANOHEPTULOSA Y DEL PALMITOIL-CoA Y DEL ACTIVADOR ALOSTÉRICO LY2121260 SOBRE LA ACTIVIDAD DEL MUTANTE MODY2 GST-GK(p.Ala449Thr).....	115
5. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA ESTABILIDAD PROTEICA DE LA GLUCOQUINASA. ENSAYOS DE TERMOESTABILIDAD.....	120
6. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA GLUCOQUINASA.....	123
6.1. INTERACCIÓN DE LA GLUCOQUINASA CON DUSP12 Y BAD.....	123
6.2. INTERACCIÓN DE LA GLUCOQUINASA CON LA PF2K-Pasa Y LA GGRP.....	128
7. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA FUNCIÓN DE LA SEÑAL DE EXPORTACION NUCLEAR DE LA GLUCOQUINASA.....	135
7.1. EFECTO DE LA LEPTOMICINA B SOBRE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA FUSIÓN GK ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ -GFP EN CÉLULAS TRANSFECTADAS.....	139
7.2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA EXPORTINA-1 SOBRE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA FUSIÓN GK ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ -GFP EN CÉLULAS TRANSFECTADAS.....	141

DISCUSIÓN

1. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA ESTRUCTURA PROTEICA Y LA CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	147
1.1. ANÁLISIS CINÉTICO Y ESTRUCTURAL DE MUTACIONES PRÓXIMAS AL CENTRO ACTIVO.....	148
1.2. ANÁLISIS CINÉTICO Y ESTRUCTURAL DE MUTACIONES ALEJADAS DEL CENTRO ACTIVO.....	149
2. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA INTERACCIÓN DE LA GLUCOQUINASA CON OTRAS PROTEÍNAS Y SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.....	157

CONCLUSIONES.....	163
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA.....	167
--------------------------	------------

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BAD	Factor de la familia BCL-2 asociado a muerte celular
BAK	<i>BCL-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL-2 associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	Albúmina bovina sérica
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
Ci	Curio
CMV	Citomegalovirus
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EEM	Error estándar medio
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(b-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético
F1P	Fructosa-1-fosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
FBS	Suero fetal bovino
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
GIP	Péptido insulínico dependiente de glucosa
GK	Glucoquinasa
GKAP	Proteína asociada a la GK
GKAs	Activadores de la GK
GKRP	Proteína reguladora de la glucoquinasa
GLP-1	Péptido semejante a glucagón 1
GLUT-2	Transportador de glucosa, isoforma 2
GST	Glutathione S-transferasa
h	Coeficiente de Hill
HA	Hemaglutinina

HI	Hiperinsulinismo Congénito
HK	Hexoquinasa
HNF	Factor Nuclear Hepatocítico
HRP	Peroxidasa de rábano
I_{ar}	Índice de actividad relativo
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactósido
kb	Kilobases
K_{cat}	Constante Catalítica
kDa	Kilodalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio de crecimiento rico para <i>Escherichia coli</i> (Luria-Bertani)
MH	D-manoheptulosa
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAG	N-acetil-D-glucosamina
NES	Señal de Exportación Nuclear
NLS	Señal de Localización Nuclear
nNOS	Isoforma Neuronal de la Óxido Nítrico Sintasa
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDB	Base de Datos de Proteínas
PF2K-Pasa	6-Fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa
PI3K	3-Fosfoinosítido Quinasa
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PMSF	Fluoruro de FenilMetilSulfonilo
PNDM	Diabetes Mellitus Neonatal Permanente
S6P	Sorbitol-6-fosfato
SD	Medio mínimo Sintético Dextrosa
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico
TBS	Tampón Tris Salino
YFP	Proteína Amarilla Fluorescente

RESUMEN

La glucoquinasa (GK) es una enzima clave en la regulación de la homeostasis de glucosa en el organismo. En la célula β pancreática, esta enzima actúa como sensor de glucosa integrando los niveles de glucemia con la secreción de insulina. En el hígado, su actividad regula el ritmo de acumulación de glucógeno y la producción de glucosa hepática. Mutaciones en el gen *GCK* que incrementan la actividad de la enzima dan lugar a hipoglucemia debido a hiperinsulinismo, mientras que las mutaciones que disminuyen la actividad de la enzima producen hiperglucemia o diabetes. Debido a su importancia en la homeostasis de glucosa esta enzima es una de las principales dianas de estudio para el desarrollo de nuevas estrategias de terapia antidiabética.

Para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la GK humana, se ha realizado la caracterización funcional de un grupo de mutaciones identificadas en pacientes con alteraciones en la homeostasis de glucosa. Once de estas mutaciones habían sido asociadas a hiperglucemia familiar y una a hipoglucemia. El estudio funcional ha consistido en analizar el defecto causado por las distintas mutaciones en la estructura proteica y en la cinética enzimática mediante ensayos de actividad *in vitro*. Además, también se ha estudiado su efecto sobre la interacción con proteínas que se asocian a la GK mediante ensayos de *pull down* y de doble híbrido en levadura y sobre la localización núcleo-citoplásmica de la enzima mediante microscopía *confocal*.

Los resultados de esta tesis han permitido dilucidar nuevos aspectos de la bioquímica de la GK, resaltando la importancia de las características cinéticas y estructurales de la glucoquinasa para su función como sensor de glucosa en la célula β pancreática, además de contribuir al esclarecimiento de la regulación de la distribución núcleo-citoplásmica de la enzima, de especial importancia para su función en el hepatocito.

INTRODUCCIÓN

1. LA HOMEOSTASIS DE GLUCOSA. PAPEL DE LA GLUCOQUINASA

La glucosa constituye la principal fuente de energía para las células de nuestro organismo por lo que el mantenimiento de unos niveles adecuados en sangre es crucial para el buen funcionamiento del mismo. Alteraciones en la homeostasis de glucosa tienen graves consecuencias. La hipoglucemia causa pérdida de consciencia llegando a producir incluso la muerte debido a la dependencia del cerebro por glucosa como combustible. Por otro lado, la hiperglucemia causa diabetes mellitus y sus diversas complicaciones.

Los mecanismos homeostáticos, seleccionados a lo largo de la evolución para mantener los niveles de glucosa en sangre dentro del rango adecuado, requieren tanto efectores como sensores. En cuanto a los efectores, los niveles fisiológicos de glucosa plasmática son mantenidos independientemente del estado nutricional, regulados por hormonas metabólicas que causan efectos sobre los distintos tejidos, especialmente sobre el músculo, el hígado y el tejido adiposo. Esta regulación está ejercida principalmente por dos hormonas producidas en el páncreas endocrino: la insulina y el glucagón.

La insulina es una hormona de naturaleza proteica sintetizada y secretada por las células β contenidas en los islotes de *Langerhans* en respuesta a incrementos en los niveles de glucosa plasmática, aminoácidos y ácidos grasos tras la ingesta de nutrientes. La respuesta de la insulina a estos secretagogos sigue un comportamiento bifásico. En la primera fase, precoz y rápida, se libera la insulina contenida en gránulos preformados. En la segunda, más tardía, menos intensa y sostenida, se libera la insulina sintetizada *de novo*. La insulina es considerada una hormona anabólica (promueve el depósito de sustratos energéticos y la síntesis de proteínas) y anticatabólica (disminuye la movilización de sustratos). Así, en el hígado favorece la síntesis de glucógeno y de triglicéridos e inhibe la glucogenolisis, la gluconeogénesis, la cetogénesis y el catabolismo proteico. En el músculo, incrementa la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno, la oxidación de cuerpos cetónicos y la síntesis de proteínas, a la vez que disminuye el catabolismo proteico y la oxidación de aminoácidos. Por otro

lado, en el tejido adiposo favorece la captación de glucosa y la síntesis de triglicéridos y disminuye la lipólisis.

El glucagón es una hormona de naturaleza proteica sintetizada y secretada por las células α pancreáticas. En contraposición con la insulina, la síntesis y secreción del glucagón es estimulada a bajas concentraciones de glucosa e inhibida cuando ésta se encuentra elevada. Esta hormona de carácter catabólico juega un papel importante en la movilización de sustratos. Así, en el hígado estimula la gluconeogénesis y la glucogenólisis y en el tejido adiposo favorece la lipólisis [1].

Existen otras hormonas implicadas en la regulación de la homeostasis de glucosa tales como las catecolaminas, los glucocorticoides o las incretinas, entre otras (Tabla 1), que también actúan como moléculas efectoras, aunque su función principal es la de modular la secreción de insulina o glucagón.

HORMONA		LUGAR DONDE SE PRODUCE	EFEECTO
Hormona adrenocorticotropa (ACTH)		Glándula pituitaria	· Estimula la producción de hormonas por las glándulas suprarrenales
Hormona del crecimiento (GH)			· Estimula la captación de glucosa por los tejidos muscular y adiposo · Estimula la gluconeogénesis hepática
Grelina		Células endocrinas del estómago	· Estimula la secreción de GH
α-amilina		Célula β	· Inhibe la secreción de glucagón
GLUCOCORTICOIDES		Glándulas suprarrenales	· Estimula la gluconeogénesis
CATECOLAMINAS	Adrenalina		· Inhibe la secreción de insulina · Estimula la secreción de glucagón
INCRETINAS	GIP	Células K (yeyuno)	· Estimula la secreción de insulina
	GLP-1	Células L (íleon)	· Estimula la secreción de insulina · Inhibe la secreción de glucagón · Ralentiza el vaciamiento gástrico
ADIPOCINAS	Leptina	Tejido adiposo	· Estimula el gasto energético
	Adiponectina		· Estimula la acción de la insulina · Inhibe la gluconeogénesis
	Resistina		· Estimula la gluconeogénesis

Tabla 1. Además de la insulina y el glucagón, existen otras hormonas implicadas en la homeostasis de glucosa y en su regulación. Se indica el tejido o tipo celular donde se producen y sus efectos.

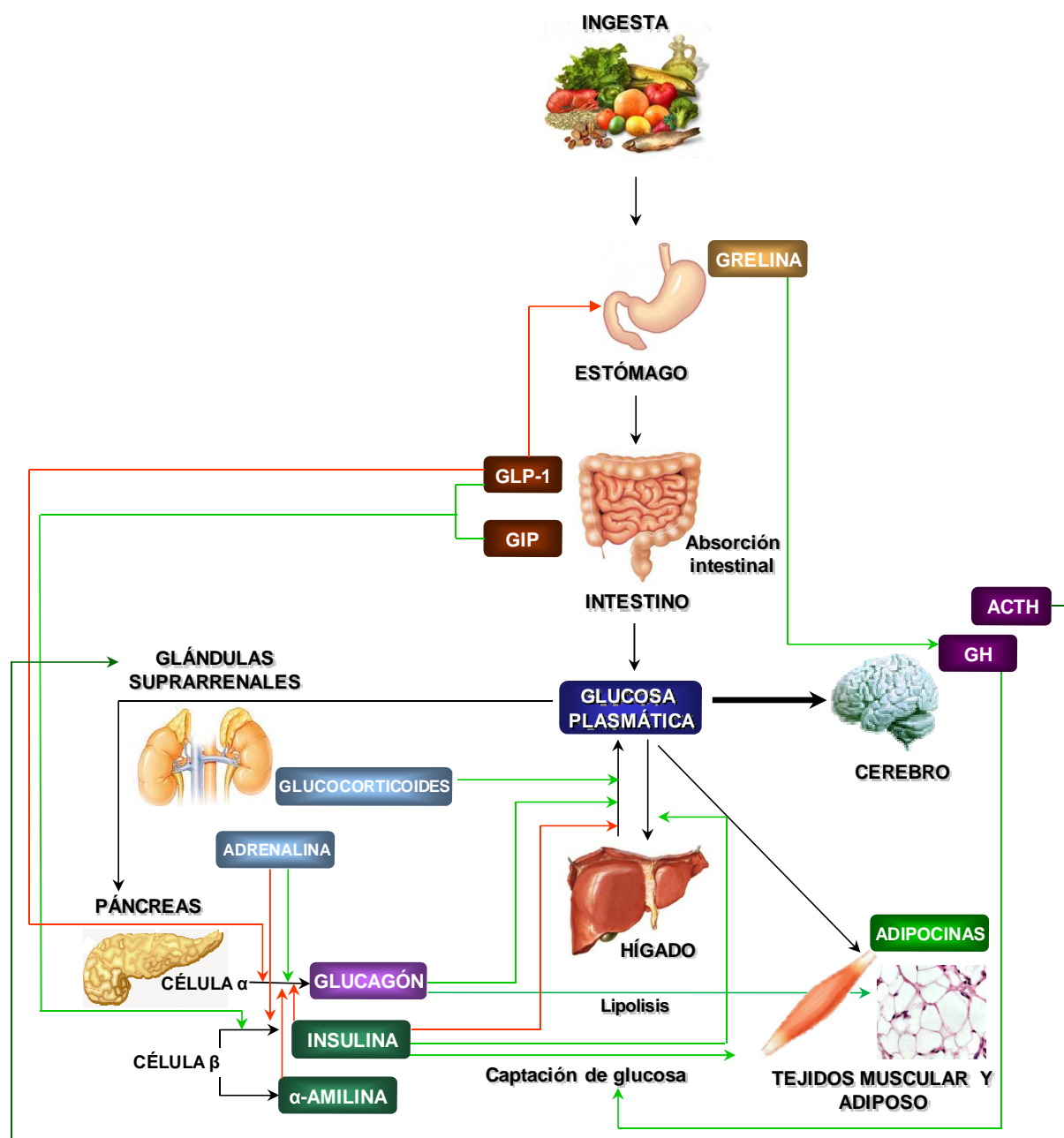


Figura 1. Regulación hormonal y tejidos implicados en la homeostasis de glucosa. La glucemia plasmática resulta del balance entre la glucosa generada (bien procedente de la ingesta o de la producción hepática) y el gasto por el sistema nervioso y tejidos periféricos. Tras la absorción intestinal de nutrientes (estado posprandial) la glucemia plasmática es elevada provocando la secreción de insulina por la célula β pancreática. La insulina ejerce su acción mediante unión a receptores específicos presentes en el organismo, principalmente en células del tejido adiposo, hepático y muscular. En el estado posprandial, la insulina controla la glucemia plasmática promoviendo la captación de glucosa por parte de los tejidos, principalmente del músculo esquelético y del hígado, donde se almacena en forma de glucógeno (glucogénesis). Además, la insulina, junto con la α -amilina y el GLP-1 suprimen la secreción de glucagón, conllevando una inhibición de la producción hepática de glucosa mediante glucogenolisis y gluconeogénesis. En esta etapa posprandial, hay una síntesis neta de sustancias de reserva. Así la insulina, además, estimula la síntesis de ácidos grasos, promueve el almacenamiento de los mismos en forma de triglicéridos en el tejido adiposo y la síntesis proteica en músculo e hígado [2]. Se indican en verde y en rojo las acciones activadoras e inhibidoras, respectivamente.

La molécula que juega el papel principal de sensor en la homeostasis de glucosa es la glucoquinasa (GK). Las principales células y tejidos involucrados en el sistema de regulación fisiológica de la homeostasis de glucosa expresan esta enzima. Así, la GK es expresada en los hepatocitos, las células α y β pancreáticas, en células entero-endocrinas de tipo L y K, en neuronas especializadas del hipotálamo y del tronco cerebral y en la glándula pituitaria, constituyéndose de esta manera una red necesaria para el mantenimiento de la homeostasis de glucosa [3].

La GK fue descrita por primera vez en 1964, por tres grupos de investigación de forma independiente, como una hexoquinasa con características estructurales y funcionales particulares que la diferenciaban del resto [4-6]. En un principio se postuló que su expresión era específica de tejido hepático, donde ejercía un papel crucial en la captación de glucosa circulante durante el estado posprandial. Sin embargo, *Matschinsky y Ellerman* en 1968, demostraron su existencia en islotes pancreáticos de ratón. Además de observar que la concentración de glucosa en esos tipos celulares se mantenía prácticamente constante respecto a la plasmática, estos autores propusieron un mecanismo doble de actuación de la GK. Así, en células β estaba implicada en la secreción de insulina estimulada por glucosa y en hepatocitos participaba en la primera etapa clave para la síntesis de glucógeno [7].

Desde su descubrimiento, muchos han sido los estudios realizados para entender el papel de esta enzima como sensor de glucosa (Tabla 2). Las alteraciones producidas por mutaciones en el gen *GCK*, que codifica por esta enzima, causantes de hiperglucemia o de hipoglucemia, junto con el descubrimiento de moléculas activadoras de la GK (GKAs) que potencian tanto la liberación de insulina estimulada por glucosa en la célula β como la utilización de la glucosa por parte del tejido hepático, ponen de manifiesto este papel fundamental en la regulación de la homeostasis de glucosa [8, 9].

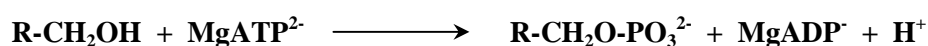
AÑO	NUEVO CONOCIMIENTO SOBRE LA GLUCOQUINASA	REFERENCIA
1964	Detección de su expresión en hígado	[4-6]
1968	Detección de su expresión en islotes pancreáticos de ratón	[7]
1975-1976	Comportamiento sigmoide respecto a la glucosa	[10-12]
1986	Detección de su expresión en islotes pancreáticos humanos	[13]
1989	Descubrimiento de la proteína reguladora de la GK	[14]
1992	Asociación con <i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>	[15, 16]
1998	Asociación con Hiperinsulinismo por insulinemia	[17]
2001	Asociación con Diabetes Mellitus Neonatal Permanente	[18]
2003	Descubrimiento del primer compuesto farmacológico activador	[19]
2003-2004	Determinación de su estructura cristalizada	[20]
2008-2009	Primeros ensayos de utilización de GKAs en pacientes diabéticos	[21, 22]

Tabla 2. Hitos históricos en la investigación de la GK.

2. BIOQUIMICA Y ESTRUCTURA DE LA GLUCOQUINASA

El papel de la GK como sensor de glucosa es posible principalmente por las características cinéticas particulares de esta enzima que la hacen sensible a los cambios en la glucemia a los que la célula es expuesta [23].

La glucoquinasa (ATP: D-glucosa-6-fosfotransferasa; EC 2.7.1.1.), enzima monomérica también conocida como hexoquinasa D o hexoquinasa IV, es una de las cuatro isoenzimas de hexoquinasa (HK) que fosforilan hexosas tales como la D-glucosa, D-manosa y D-fructosa, en vertebrados [24]. La reacción catalizada consiste en la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP a la hexosa, para dar la correspondiente hexosa-6-fosfato, según la siguiente ecuación:



En mamíferos, las cuatro isoenzimas de hexoquinasa, referidas como I-IV o A-D difieren tanto en su estructura proteica como en su regulación [25, 26]. Según la

nomenclatura propuesta por la Unión Internacional de Bioquímica, las glucoquinasas son específicas para glucosa mientras que las hexoquinasas pueden fosforilar además otras hexosas. Aunque la glucoquinasa también puede fosforilar otros monosacáridos como D-manosa y D-fructosa, presenta una afinidad muy baja por ellos (25 y 300 mM, respectivamente) y debido a que la α -D-glucosa es el sustrato en condiciones fisiológicas, el término de “glucoquinasa” es más aceptado en la literatura que el de hexoquinasa IV o D y es el que por lo tanto se utilizará a lo largo de este texto.

Las HK I, II y III poseen una alta afinidad por glucosa (valor de la constante de afinidad de 0.02-0.2 mM) y son sensibles a la inhibición por glucosa-6-fosfato (G6P). A diferencia del resto de hexoquinasas, la GK presenta una baja afinidad por glucosa (valor de la constante de afinidad de 7-9 mM) y no es inhibida por sus metabolitos producto, G6P y ADP, ni por otros intermediarios o cofactores del metabolismo de glucosa, a concentraciones fisiológicas [27].

Las isoenzimas I a III son proteínas de aproximadamente 100 kDa, mientras que la GK es una proteína de aproximadamente 50 kDa y 465 aminoácidos. Se ha observado una alta homología de secuencia entre las mitades N-terminal y C-terminal de las hexoquinasas cuando se comparan entre sí y cuando se comparan a la GK. Esta alta homología de secuencia podría deberse a un origen común de los correspondientes genes que evolucionaron a partir de un gen ancestral mediante mecanismos de duplicación, fusión génica y mutaciones que dio lugar a las distintas isoenzimas con la adquisición de funciones reguladoras propias [28].

A diferencia de las otras isoenzimas de HK de mamíferos, la actividad de la GK exhibe un comportamiento sigmoideo respecto a glucosa en lugar de un comportamiento hiperbólico *michaeliano* propio de enzimas no alostéricas, con un punto de inflexión comparable a la glucemia basal (Figura 2) [29]. Con respecto a su segundo sustrato, ATP, la GK presenta un comportamiento puramente *michaeliano*, con una constante de afinidad (K_m) de 0.3-0.6 mM, inferior a la concentración intracelular de esta molécula (2.5 mM), indicando que el flujo metabólico depende prácticamente en su totalidad de la concentración de glucosa y de GK en la célula [30].

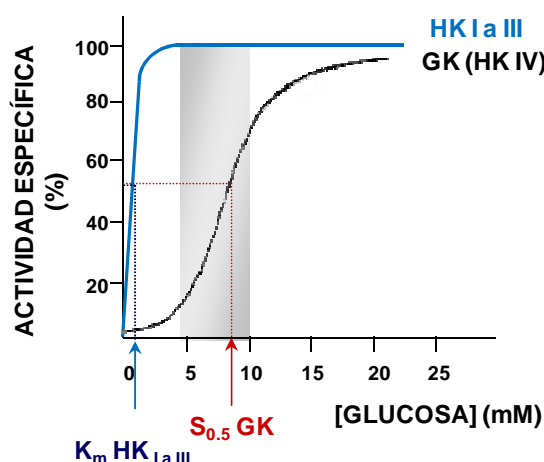


Figura 2. Curvas de saturación por glucosa de las distintas isoenzimas de hexoquinasa de mamíferos. La GK muestra un comportamiento sigmoideo respecto a glucosa que contrasta con el comportamiento hiperbólico de las HK. Se indica de color gris el rango correspondiente a la concentración fisiológica de glucosa en sangre (4-10 mM). Se representa el valor de la K_m de las hexoquinasas I a III y el valor de la $S_{0.5}$ de la GK.

2.1. COOPERATIVIDAD POR GLUCOSA: MODELOS CINÉTICO Y ESTRUCTURAL

La GK muestra un comportamiento cooperativo respecto a glucosa con un coeficiente de Hill (h) de 1.5-1.9 [31, 32]. Los modelos clásicos de cooperatividad positiva implican interacciones entre múltiples subunidades y no pueden aplicarse a enzimas monoméricas, excepto si presentan múltiples centros activos en una misma cadena polipeptídica [33-35]. Teniendo en cuenta que la enzima GK es catalíticamente activa en forma monomérica y que solamente alberga un sitio de unión a glucosa (el centro activo), los modelos clásicos de cooperatividad no son fácilmente aplicables a esta enzima [36, 37]. Se propusieron entonces dos modelos para explicar el modelo cinético de la GK: el modelo *mnemónico* y el modelo de *transición lenta inducida por ligando* [32, 38]. Ambos modelos asumen la existencia de dos estados conformacionales de la enzima, con afinidades diferentes por glucosa, que se interconvierten lentamente al unirse la glucosa al centro activo (Figuras 3 y 4). Debido a que la velocidad de esta transición conformacional es lenta comparada con el ciclo catalítico, los dos estados conformacionales no alcanzan el equilibrio y el cambio inducido por glucosa en la distribución entre los estados de afinidad alta y baja es responsable de la cooperatividad positiva de la enzima [39].

Aunque ambos modelos podrían explicar satisfactoriamente la mayoría de los hechos que ocurren en la cinética de la GK, el modelo de *transición inducida por ligando* se ajusta mejor a algunos de los más finos detalles de la cinética de la enzima [39].

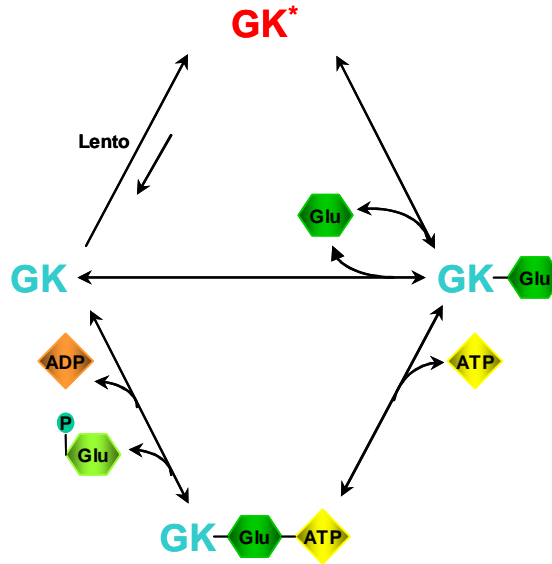


Figura 3. Modelo mnemónico propuesto para la GK. Este modelo propone la existencia de dos conformaciones de enzima diferentes, GK y GK*, que se interconvierten de una manera lenta. La forma más estable (GK*) predomina en ausencia de sustratos que puede presentar dos conformaciones diferentes. El equilibrio en la interconversión puede ser alterado por la unión de glucosa a la enzima, entrando en un ciclo catalítico [40]. Esquema adaptado de [41].

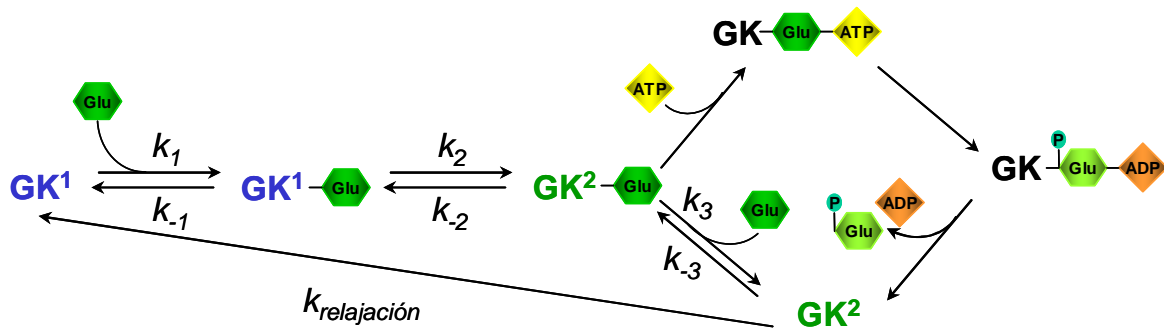


Figura 4. Modelo cinético de transición lenta inducida por glucosa propuesto para la GK. En ausencia de glucosa, la GK existe en una conformación termodinámicamente estable (GK¹) que presenta una afinidad baja por glucosa. La unión del sustrato (Glu) ocurre a través de un mecanismo con dos etapas. La primera fase, k_1 , implica la formación reversible de un intermediario (GK¹-Glu), seguido de un cambio conformacional lento, k_2 , a una forma catalíticamente activa, GK²-Glu, la cual es capaz de unirse a su segundo sustrato ATP entrando en un ciclo catalítico. Tras la liberación de los productos ADP y G6P, la enzima mantiene la forma activa y de alta afinidad GK², que puede unirse a glucosa (k_3) o volver al estado inicial GK¹ ($k_{relajación}$). El cambio conformacional (k_2) es lento en comparación con el recambio catalítico. Adaptado de [39].

La determinación del modelo estructural para la GK ha permitido entender su modelo cinético. Previamente a la obtención de la estructura cristalizada de la GK, se propusieron modelos estructurales para esta enzima basados en su homología con distintas hexoquinasas. La cadena polipeptídica de las hexoquinasas se encuentra plegada formando dos dominios estructurales, entre los que se localiza el sitio activo de fosforilación [42]. Inicialmente, se propuso un modelo estructural para la GK humana en base a la homología de secuencia (30%) que mantiene con la hexoquinasa de levadura, la cual había sido cristalizada en presencia de un inhibidor y también en presencia de glucosa [42-44]. Así, se propuso que la GK podría adoptar dos conformaciones diferentes, abierta y cerrada, dependiendo de la ausencia o presencia de glucosa, respectivamente [45, 46].

Unos años después, la HK-I humana fue cristalizada en presencia de glucosa con G6P o con fosfato [47, 48]. La isoforma pancreática de la GK humana mantiene una homología en su secuencia del 54% y 50% con las subunidades catalítica C-terminal y reguladora N-terminal de la HK-I, respectivamente. La unión de glucosa a la hendidura donde se encuentra el centro activo de la HK-I induce un cambio conformacional que implica una rotación en sus dominios desde la forma abierta a la cerrada de la misma manera que en la HK de levadura [45]. Mahalingham y cols en 1999 propusieron un modelo estructural para la GK basado en la homología con la estructura cristalizada de la HK-I y el efecto de mutaciones identificadas en la GK sobre la afinidad a sus sustratos, determinando que la glucosa establece interacciones mediante puentes de hidrógeno con los residuos Ser¹⁵¹, Thr¹⁶⁸, Lys¹⁶⁹, Asn²⁰⁴, Asp²⁰⁵, Asn²³¹, Glu²⁵⁶ y Glu²⁹⁰ de la secuencia polipeptídica de la enzima [49].

En 2004 Kamata y cols obtuvieron la estructura cristalizada de la GK humana ligada a glucosa y a un activador de la enzima (GKA; *N*-thiazol-2-yl-amino-4-fluoro-5-(1-methylimidazol-2-yl) thiobenzamide) y de la GK libre. Para reducir la flexibilidad estructural de la enzima que impedía su cristalización se suprimieron los primeros aminoácidos del extremo N-terminal. En el caso de la forma ligada se suprimieron once residuos y en el caso de la forma libre se suprimieron quince [20]. La estructura cristalizada de la GK determinada en presencia de glucosa y del activador GKA

mostró que, de forma similar a la HK-I cristalizada en presencia de glucosa, la cadena polipeptídica de la GK se encuentra plegada formando dos dominios de distinto tamaño, los dominios mayor y menor, separados por una hendidura que forma el sitio activo de fosforilación, donde se sitúa una molécula de α -D-glucosa [20]. Por homología con la HK-I a esta estructura se la denomina conformación “cerrada” y muestra un acercamiento entre los dominios mayor y menor de la enzima. Los residuos directamente encargados de la unión a glucosa se localizan en la hendidura situada entre los dos dominios. Entre ellos se encuentran residuos del dominio mayor (Glu²⁵⁶ y Glu²⁹⁰), del dominio menor (Thr¹⁶⁸ y Lys¹⁶⁹) y de la región conectora II (Asn²⁰⁴ y Asp²⁰⁵) [20]. Sin embargo, con diferencia a la HK-I, la región conectora I de la GK, constituyente de la bisagra entre dominios, presenta una estructura flexible y expuesta al solvente, que le permite una mayor apertura en el cambio conformacional. Próximo a esta región bisagra se localiza el centro de unión del compuesto GKA, denominado sitio alostérico, donde se unen también otras moléculas activadoras. Esta región, separada del sitio activo de la enzima, se encuentra delimitada por la región conectora I, la lámina β -1 y hélice α -5 del dominio mayor y la hélice α -13 del dominio menor (Figura 5) [20].

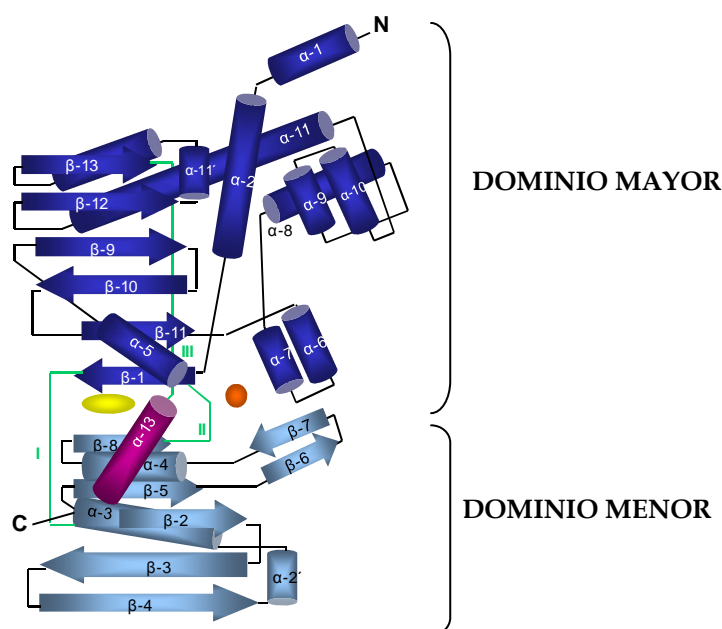


Figura 5. Representación de la estructura proteica de la GK en presencia de glucosa y del activador GKA. La GK se encuentra constituida por el dominio mayor (azul oscuro) y el dominio menor (azul claro y magenta). Las regiones conectoras I-III se muestran de color verde. La hélice α -13 (magenta) del extremo C-terminal forma parte del dominio menor de la enzima en la conformación cerrada. La glucosa y el activador GKA se indican de color naranja y amarillo, respectivamente. Esquema adaptado de [20].

En su forma libre, la estructura del dominio mayor se mantiene respecto a la conformación cerrada de la enzima ligada. Sin embargo, el dominio menor rota 99° en comparación con la conformación cerrada. Debido a que esta relación espacial también es diferente comparada con la estructura “abierta” de la HK-I, la conformación que adopta la GK libre se denomina “super-abierta”. En esta conformación, el principal cambio ocurre en la organización y orientación del dominio menor respecto a la conformación cerrada. La hélice α -13, localizada en el extremo C-terminal de la región proteica y parte del dominio menor en la conformación cerrada, en la conformación super-abierta se sitúa entre los dominios mayor y menor de la enzima. Por otra parte, el sitio alostérico no se encuentra accesible en la conformación super-abierta (Figura 6) [20].

La diferencia en la estructura proteica de la GK libre con la HK-I, en ausencia de glucosa, se debe principalmente a la mayor flexibilidad de estructura de la región bisagra que conecta los dos dominios de la proteína. Por otra parte y debido a la alta homología entre las dos proteínas, se ha postulado la existencia de una conformación abierta similar a la mostrada por la HK-I pero cuya estructura cristalizada no se ha establecido aún. La transición entre las formas abierta y cerrada sería más rápida que la transición entre las formas super-abierta y abierta, que requeriría una mayor reorganización molecular. Mediante ensayos de fluorescencia de triptófano se ha confirmado la existencia de múltiples conformaciones diferentes según las concentraciones de ligandos [50].

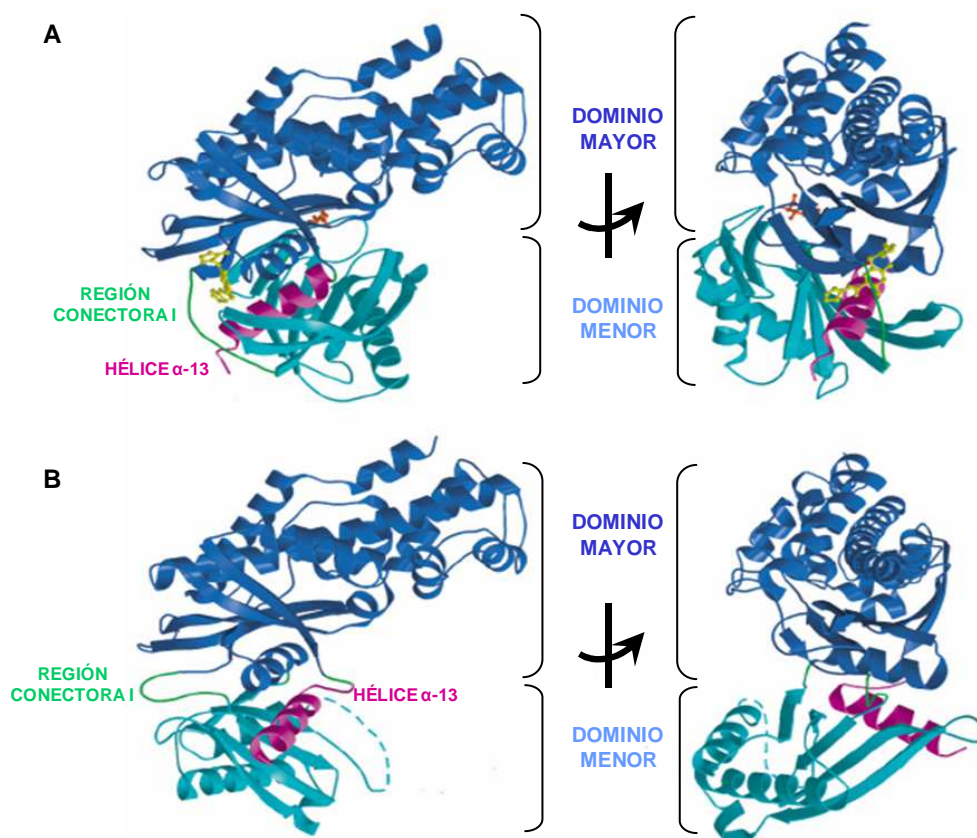


Figura 6. Modelo estructural de la GK. Se muestran los dominios mayor y menor de la enzima en azul oscuro y azul claro, respectivamente. Los dos dominios se encuentran conectados por las regiones conectoras (verde). La hélice α -13 (magenta) se localiza en el dominio menor en la conformación cerrada de la GK. **A.** GK en conformación cerrada (PDB, código IV4S) en presencia de glucosa (naranja) y del activador GKA (amarillo). **B.** GK en conformación super-abierta (PDB, código IV4T). La hélice α -13 se libera del dominio menor en esta conformación. Adaptado de [20].

El modelo cinético, basado en la estructura cristalizada de la enzima, propone que la GK libre se encuentra en su forma termodinámicamente más estable super-abierta (inactiva) (Figura 7). Tras la unión inicial de la glucosa, la GK experimenta un cambio conformacional lento que acerca físicamente los dominios mayor y menor de la enzima, resultando en la conformación intermedia abierta y posteriormente cerrada que ya puede unir ATP. Al completarse la reacción, la GK vuelve a la conformación intermedia abierta para liberar los productos G6P y ADP. Si en este estado la glucosa se une de nuevo, entra en un nuevo ciclo catalítico. De lo contrario, pasa de nuevo a la conformación super-abierta inactiva. Los cambios conformacionales entre la forma super-abierta y la forma abierta son más lentos que los cambios experimentados en la transición de la forma abierta a la forma cerrada durante la fosforilación de la glucosa. La ocurrencia de los ciclos rápido y lento depende de la concentración de glucosa y del tiempo en el que la GK permanece en conformación abierta. A con-

centraciones bajas de glucosa, la reacción catalizada por la GK tiene lugar mayoritariamente mediante el ciclo lento, ya que en ausencia de este sustrato la forma superabierta es la conformación termodinámicamente más estable. Cuando la concentración de glucosa es suficientemente alta, la reacción ocurre mediante el ciclo rápido [20, 49]. La existencia de estos dos ciclos explicaría la cinética sigmoidea y la cooperatividad por glucosa.

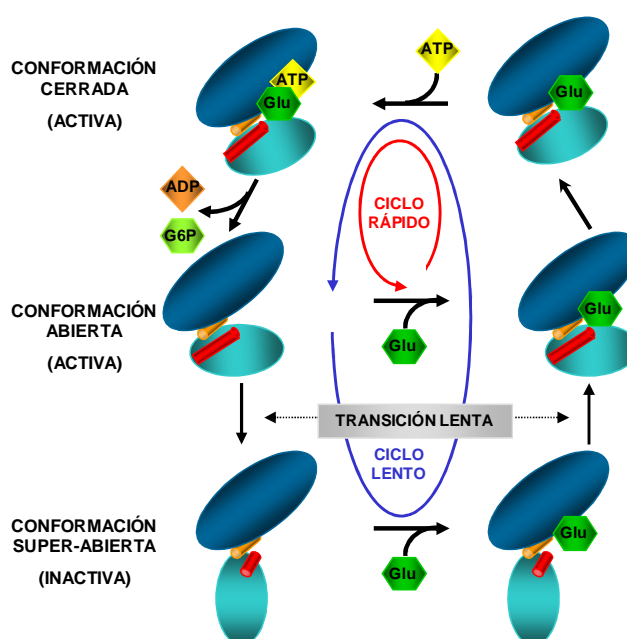


Figura 7. Modelo cinético de la glucoquinasa. Se postula que la glucoquinasa existe en tres conformaciones diferentes (cerrada, abierta y super-abierta) y que puede seguir dos ciclos catalíticos (rápido y lento). La relación entre los dos ciclos es responsable del comportamiento sigmoideo frente a la glucosa. En la imagen (adaptada de [20]) se representan el ciclo lento, en el que la glucosa entra en el bolsillo catalítico en la forma super-abierta o inactiva de la enzima y el ciclo rápido, en el que la glucosa se une a la forma abierta o activa.

Si la identificación de los residuos de la GK que interaccionan con la glucosa en el centro activo y del activador GKA en el centro alostérico fueron identificados en la estructura cristalizada, en base a la comparación de la estructura de la HK-I y otras proteínas con capacidad de hidrolizar ATP además de la utilización de técnicas de fluorescencia, se ha propuesto que el ATP-Mg²⁺ establecería interacciones con residuos del centro activo localizados en una posición más externa que la ocupada por glucosa, destacando los residuos Asp⁷⁸, Thr⁸², Thr²²⁸ y Ser³³⁶ [51-54].

3. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA

3.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

El gen de la GK humana (GCK) se localiza en la región p15-p14 del cromosoma 7 y ocupa aproximadamente 45 kb. Está compuesto por 12 exones denominados 1a, 1b, 1c, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En mamíferos, la expresión del gen de la GK está regulada por dos promotores diferentes y específicos de tejido: el promotor hepático y el promotor neuroendocrino, separados por aproximadamente 30 kb [55]. La existencia de dos promotores alternativos permite el control de la iniciación de la transcripción por sistemas de regulación tisular específicos. El promotor distal, denominado promotor neuroendocrino, es responsable de la síntesis del mRNA de la GK en las células del eje neuroendocrino (células α y β pancreáticas, células entero-endocrinas y neuronas especializadas). En cambio, el promotor proximal, denominado promotor hepático, se asocia con la transcripción en hepatocitos. Los exones 1a y 2 a 10 codifican el transcrito de la isoforma expresada mayoritariamente en célula β , GK I. En el hígado se expresan dos isoformas de la enzima, L_1 y L_2 . Mientras que los exones 1b, 1c y 2 a 10 codifican el transcrito de la isoforma L_2 de 464 aminoácidos, los exones 1b y 2 a 10 codifican el transcrito de la isoforma L_1 de 466 aminoácidos, siendo ésta la isoforma mayoritaria (Figura 8) [56]. Las isoformas de GK expresadas en tejido hepático y tejidos del eje neuroendocrino difieren en 15 aminoácidos del extremo N-terminal de su secuencia peptídica [55, 57]. A pesar de ello, las diferentes isoformas no presentan efectos significativos en los parámetros cinéticos [58].

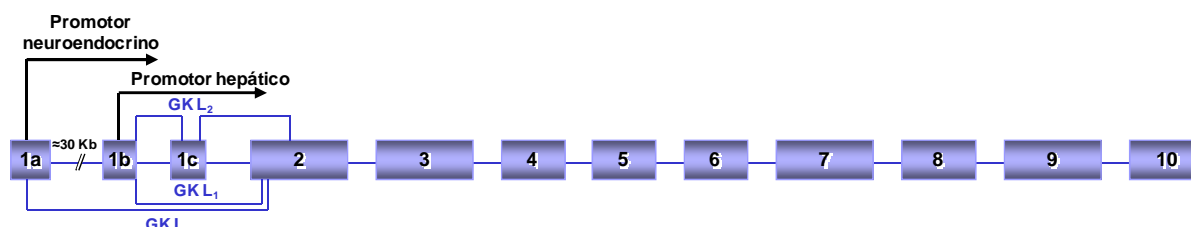


Figura 8. Organización exón-intrón del gen GCK. Los exones se muestran como rectángulos numerados separados por intrones representados por líneas. Las flechas sobre los exones 1a y 1b indican el inicio de la transcripción a partir del promotor neuroendocrino y hepático, respectivamente. Los exones 1a y 2 a 10 codifican el transcrito de la isoforma GK I. En el hígado los exones 1b, 1c y 2 a 10 codifican el transcrito de la isoforma L_2 y los exones 1b y 2 a 10 codifican el transcrito de la isoforma L_1 . Adaptado de [59].

3.1.1. REGULACIÓN DEL PROMOTOR HEPÁTICO

En el hígado, la expresión del gen *GCK* es dependiente de insulina. Los niveles de expresión de la isoforma hepática de la GK se mantienen muy bajos durante el ayuno y en situaciones de deficiencia de insulina como la diabetes, pero se incrementan tras la ingesta o tras el tratamiento con insulina debido a la inducción del gen *GCK* por parte de esta hormona [60, 61].

Se ha demostrado que esta inducción ocurre tras la unión de la insulina a su receptor y a través de la activación de la vía de la 3-fosfoinosítido quinasa (PI3K) y la activación de la PKB/Akt [62]. Sin embargo, no se conocen con certeza los elementos regulados en *cis* (elementos de respuesta a insulina, IRE, en el promotor hepático de la GK) ni los activadores transcripcionales que pudieran mediar esta respuesta. Inicialmente se propuso que el factor de transcripción SREBP-1c (isoforma 1c de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides), regulador de la expresión de enzimas lipogénicas, era un mediador de la inducción de la expresión génica de la GK hepática por parte de la insulina [63]. Por otra parte, se ha descrito que el promotor hepático de *GCK* contiene también un sitio de unión para otros factores de transcripción como por ejemplo PPAR- γ (receptor G activado de proliferador de peroxisoma), HIF-1 α (factor 1a inducible por hipoxia) y los factores nucleares hepatocíticos HNF-3 β , HNF-4 α y HNF-6 (revisado en [64]). En hepatocitos, los factores HIF-1 α y HNF-4, junto con el coactivador p300, participan en la inducción de la expresión de la isoforma hepática de GK en respuesta a insulina [65].

Existen además otros factores reguladores que pueden modular la transcripción génica de *GCK* en el hígado. El glucagón, a través de su segundo mensajero AMPc, disminuye los niveles de expresión, actividad y de la vida media de su mRNA. El efecto negativo del glucagón prevalece sobre el de la insulina, quedando reprimida la expresión del gen *GCK* en el hígado durante el ayuno. Otros factores implicados en la expresión génica de la isoforma hepática de GK son los glucocorticoides, la hormona triyodotironina (T3), la biotina y el ácido retinoico, que pueden jugar un papel positivo en el incremento de los niveles del mRNA (revisado en [66]).

3.1.2. REGULACIÓN DEL PROMOTOR NEUROENDOCRINO

Existe controversia en cuanto a la naturaleza del control de la expresión del gen GCK en tejidos del eje neuroendocrino. Clásicamente se ha mantenido que este promotor es constitutivamente activo en las células donde regula la transcripción génica y que la regulación es ante todo a nivel postranscripcional o postraducciona. La glucosa juega un papel importante en la modulación de la actividad GK [67-69]. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la expresión del gen GCK dirigida por el promotor neuroendocrino es modulada positivamente por el AMPc, la biotina, el ácido retinoico y el lactógeno placentario (*revisado en [66]*). Además, se ha descrito que la insulina estimula la expresión génica de la isoforma neuroendocrina de la GK, postulándose que la hormona, liberada por la célula β tras la estimulación con glucosa, sirve como un regulador transcripcional autocrino de la expresión del gen GCK en célula β [70, 71].

3.2. REGULACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL

3.2.1. ESTABILIZACIÓN POR GLUCOSA

En la célula β , la glucosa juega el papel principal en la regulación de la actividad GK [67-69]. Se ha descrito que la modificación de la expresión de GK por glucosa en las células que responden a ella es debida en parte a la estabilización de la proteína por unión a su ligando, aunque también se ha sugerido un efecto de la glucosa en la estabilización del mRNA frente a su degradación [72, 73].

3.2.2. MODIFICACIÓN COVALENTE: FOSFORILACIÓN, OXIDACIÓN Y NITROSILACIÓN

Se ha descrito que la isoforma hepática de la GK de rata se modifica mediante fosforilación *in vitro* de un residuo de serina por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) conllevando la inactivación parcial de la enzima [74, 75]. La GK contiene un motivo conservado, RRXT (residuos 428-431) y dos motivos RXS (residuos 359-

361 y 395-398). El motivo RXS es un sustrato para la PKA *in vitro*, pero no *in vivo*, mientras que RRXS/T es un motivo que sirve a menudo como sustrato *in vivo* [76]. Sin embargo, se desconoce si la fosforilación de la GK por la PKA contribuye a la inhibición de la fosforilación de glucosa por glucagón.

Las hexoquinasas de mamíferos y de levadura pueden autofosforilarse en un residuo conservado de serina (Ser¹⁵⁸ en la HK de levadura correspondiente a Ser¹⁵¹ en la GK) [77]. Esta modificación inactiva la enzima, debido a que este residuo está implicado en la afinidad por glucosa y en los cambios conformacionales durante el ciclo catalítico. En levadura, la autofosforilación de Ser¹⁵⁸ es estimulada por una fosforilación previa de Ser¹⁴ que tiene lugar *in vivo* a concentraciones bajas de glucosa [78]. La GK humana también se puede autofosforilar *in vitro* [44], aunque se desconoce su significado fisiológico y si requiere la fosforilación previa de otros residuos.

La GK presenta un alto contenido en residuos de cisteína, los cuales son susceptibles de oxidación o nitrosilación. La modificación de grupos tiol o sulfidrilo (-SH) presentes en los residuos de cisteína tienen como consecuencia una inactivación de la actividad catalítica de la GK [79]. Se ha observado que en ausencia de agentes reductores, tales como el mercaptoetanol o el ditriotritol, los residuos de cisteína próximos al sitio de unión de la glucosa pueden oxidarse formando puentes disulfuro que bloquean los cambios conformacionales requeridos durante la catálisis [80]. El óxido nítrico reacciona con los grupos tiol de las cisteínas formándose un grupo nitrosotiol. Este mecanismo, denominado S-nitrosilación, es un proceso reversible que constituye un tipo de modificación postraducciona de las proteínas. Cuatro de los residuos de la secuencia peptídica de la GK forman parte de motivos de S-nitrosilación (Cys²²⁰, Cys³⁶⁴, Cys³⁷¹ y Cys⁴³⁴) y dos de ellos (Cys³⁶⁴ y Cys³⁷¹) pueden nitrosilarse en células β [81].

3.2.3. REGULACIÓN ALOSTÉRICA

La actividad GK es inhibida no sólo por análogos de sustrato como la N-acetilglucosamina y la D-manoheptulosa, sino también por acil-CoAs de cadena larga

como el palmitoil-CoA [82, 83]. Los acil-CoAs de cadena larga son potentes inhibidores alostéricos que actúan de forma competitiva con respecto a ambos sustratos, glucosa y ATP. La inhibición de la GK por palmitoil-CoA ocurre por unión del inhibidor a un lugar distinto al centro activo seguido de un cambio conformacional [84]. En el hepatocito se ha descrito un leve efecto inhibitorio de la fosforilación de glucosa y una disminución en el contenido de G6P en presencia de palmitato [85], por lo que es plausible la supresión fisiológica de la actividad GK a concentraciones elevadas de ácidos grasos. Otra molécula que actúa como inhibidor alostérico de la GK y cuya función y papel fisiológico han sido ampliamente estudiados es la proteína reguladora de la glucoquinasa, que se describe en el siguiente apartado.

En cuanto a posibles activadores alostéricos, *Wals y cols* en 1994 fueron los primeros en proponer la existencia de activadores endógenos de la GK, en base a las discrepancias en la fosforilación de glucosa observadas *in vitro* e *in vivo* en hepatocitos [86]. Por otra parte, el descubrimiento de compuestos farmacológicos que incrementan la actividad de la enzima por unión al sitio alostérico apoya la existencia de moléculas endógenas con un efecto activador sobre la GK [3]. Sin embargo, por el momento no se conocen activadores alostéricos fisiológicos de la GK y se han propuesto varias proteínas que, por incrementar la actividad GK, podrían actuar como activadores endógenos, aunque no en todos los casos se conoce su significado fisiológico. Estas proteínas son detalladas en el siguiente apartado.

3.1. INTERACCIÓN DE LA GLUCOQUINASA CON OTRAS PROTEÍNAS: PAPEL EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

La GK puede estar regulada por otras proteínas que modulan su actividad catalítica y localización subcelular. Entre estas proteínas, se encuentran la proteína reguladora de la glucoquinasa (GKRP) [84], la enzima 6-fosfofructo-2-quinasa-2,6-bisfosfatasa (PF2K-Pasa) [87], el factor de la familia Bcl-2 asociado a muerte celular (BAD) [88], la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (nNOS) [81], una fosfatasa dual específica (GKAP/DUSP12) [75], el precursor de la subunidad β de la pro-

pionil-CoA carboxilasa [89] y la pentaubiquitina [90], aunque algunas de estas interacciones no están bien caracterizadas o se desconoce su significado fisiológico.

3.1.1. FOSFATASA DUAL GKAP/DUSP12

La asociación entre la GK y la fosfatasa GKAP fue detectada mediante ensayos de doble híbrido en levadura, utilizando una librería de cDNA hepático de rata y la GK como cebo [75]. Aunque esta proteína fosfatasa fue denominada GKAP (*glucokinase-associated protein*), en humanos está codificada por el gen *DUSP12*. GKAP/DUSP12 pertenece a una familia de fosfatasas que pueden desfosforilar residuos de fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina. En el mismo trabajo, los autores describieron que esta proteína, localizada en el citoplasma, podía desfosforilar residuos de serina de la GK previamente fosforilados *in vitro* por la proteína quinasa A e incrementar la actividad de la enzima cuando la fosfatasa se encontraba en amplio exceso frente a la GK [75]. Sin embargo, el significado fisiológico de esta posible regulación se desconoce. Un estudio posterior estableció una asociación entre polimorfismos en el gen de la fosfatasa dual DUSP12 con diabetes mellitus tipo 2 [91].

3.1.2. PRECURSOR DE LA SUBUNIDAD β DE LA PROPIONIL-CoA CARBOXILASA

La asociación entre el precursor de la subunidad β de la propionil-CoA carboxilasa (p β PCCasa) y la GK fue detectada mediante ensayos de doble híbrido en levadura utilizando una librería de cDNA de célula β [89]. El p β PCCasa es sintetizado en el citoplasma y transferido a la matriz mitocondrial donde es procesado para dar lugar a la enzima propionil-CoA carboxilasa [92]. Este precursor activaba a la GK, incrementando la velocidad máxima de la reacción y la afinidad de la enzima por glucosa *in vitro*, cuando se encontraba presente en unas concentraciones muy superiores al rango fisiológico, por lo que el posible significado fisiológico está aún por determinar [89].

3.1.3. ISOFORMA NEURONAL DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

La GK puede asociarse a los gránulos secretores de insulina [93-95]. Esta asociación conlleva una disminución en la actividad de la enzima [95]. En 2003, *Rizzo y Piston* encontraron que la asociación de la GK a los gránulos de insulina tenía lugar a través de la interacción con la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (nNOS) [81]. nNOS, responsable de la síntesis de óxido nítrico, se localiza en la superficie de los gránulos de insulina y es activada por insulina y por un incremento en los niveles de iones Ca^{2+} durante la secreción de la hormona estimulada por glucosa en la célula β [96]. La S-nitrosilación de la Cys^{371} en la GK facilita la disociación de ambas proteínas, quedando la GK activa en el citoplasma (Figura 9) [81]. *Ding y cols* identificaron mutaciones asociadas a hiperglucemia familiar, localizadas muy próximas a este residuo de cisteína, que bloquean la S-nitrosilación y la activación de la GK del mismo modo que la mutación p.Cys371Ser [97].

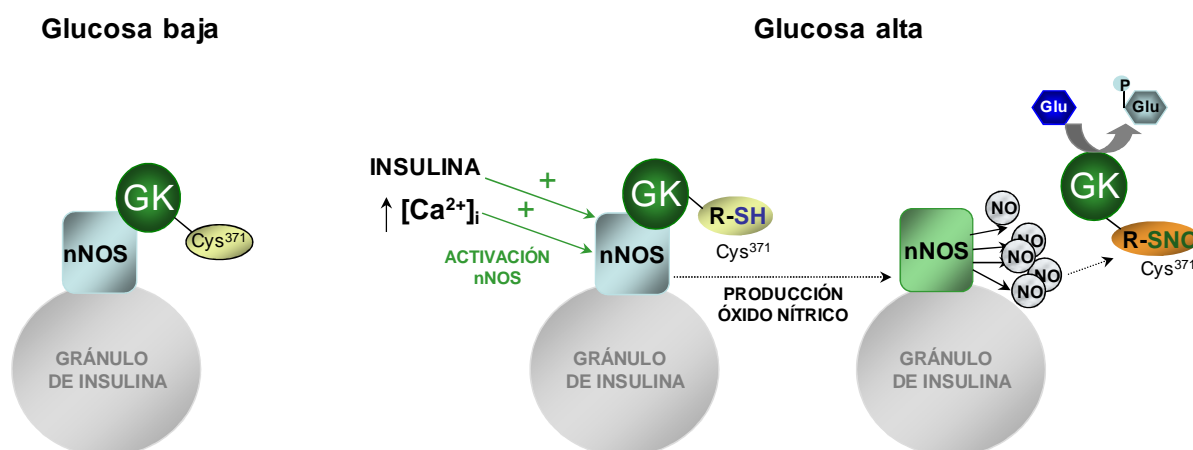


Figura 9. Regulación de la actividad y localización subcelular de la GK por interacción con nNOS. A concentraciones bajas de glucosa existe una fracción de GK asociada a los gránulos de insulina interaccionando con la enzima nNOS. A concentraciones elevadas de glucosa se incrementan los niveles de Ca^{2+} en la célula β desencadenando la secreción de insulina. Ambos factores producen la activación de nNOS que sintetiza óxido nítrico (NO). El óxido nítrico reacciona con el grupo tiol de la Cys^{371} de la GK, produciendo la disociación del complejo.

3.1.4. PENTAUBIQUITINA

La ubiquitina es una pequeña proteína que se une covalentemente a otras, etiquetándolas para su degradación en el proteasoma. En la GK humana se ha identificado una secuencia consenso para la ubiquitinación y para la interacción con políme-

ros de ubiquitina en la hélice α -13, correspondiente al extremo C-terminal. A pesar de que se desconoce su significado fisiológico, se ha observado que la interacción de un oligómero de pentaubiquitina libre al sitio alostérico de la GK produce un incremento de la actividad específica de la enzima *in vitro* [90].

3.1.5. BAD

BAD (*Bcl-2-associated death promoter*) es una proteína perteneciente a la familia BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), la cual tiene un papel importante en apoptosis ya que regula la liberación de factores promotores de muerte celular [98].

La proteína BAD y la fracción de la GK asociada a la membrana externa mitocondrial forman parte de un complejo multiproteico, constituido además por las subunidades catalíticas de las proteínas quinasa A y fosfatasa 1 (PP1) y por WAVE-1 (un miembro de la familia *Verprolin-homologous Wiscott-Aldrich*), tanto en hepatocitos como en células β [88]. El núcleo principal de este complejo es la proteína BAD, ya que en ratas donde se ha suprimido la expresión de su gen (*bad* $-/-$) este complejo desaparece [88, 99]. En hepatocitos, la interacción BAD-GK parece estar implicada en la regulación del metabolismo oxidativo, ya que la respiración mitocondrial estaba disminuida en los hepatocitos de ratas *bad* $-/-$ [88, 99]. Por otra parte, estudios posteriores mostraron una disminución en la actividad GK y una alteración en la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes aislados de ratones *bad* $-/-$. Se propuso que BAD posee la capacidad bifuncional de participar en el control de la secreción de insulina estimulada por glucosa y regular la apoptosis (Figura 10). BAD contiene un dominio BH3, constituido por una hélice α anfipática mediante la que se asocia a las proteínas BCL-2 y BCL-XL neutralizando su actividad antiapoptótica y activando así a factores proapoptóticos como BAX y BAK. Sin embargo, a concentraciones altas de glucosa, factores de supervivencia celular inducen la fosforilación de BAD en residuos de serina. La fosforilación de BAD en la Ser¹⁵⁵ bloquea su capacidad de interacción con los factores anti-apoptóticos y permite aumentar la fracción de BAD unida a la GK, potenciando la secreción de insulina y la supervivencia de las células β , resultando en un incremento de la masa en este tipo celular [100].

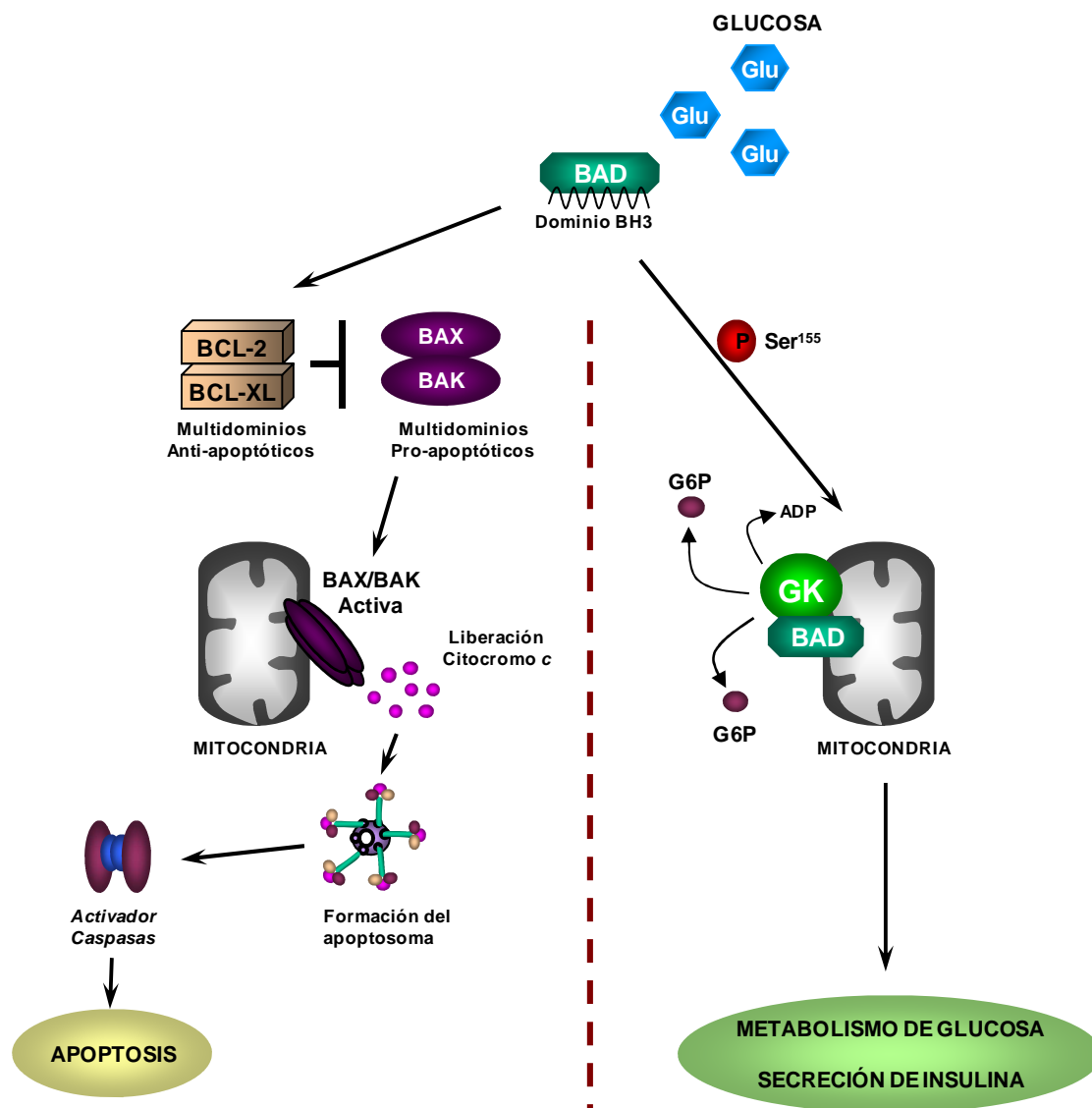


Figura 10. Implicación de BAD en secreción de insulina y supervivencia en célula β . La proteína BAD juega un doble papel en célula β , en la secreción de insulina y en la apoptosis, conferido por la presencia de un dominio BH3 en su secuencia. La fosforilación de la Ser¹⁵⁵ en este dominio hace que BAD asuma un papel metabólico mediante activación de la GK, induciendo la secreción de insulina. BAD en su estado desfosforilado se asocia a elementos antiapoptóticos bloqueándolos e induciendo apoptosis. La apoptosis, junto con otros reguladores positivos y negativos del crecimiento, proliferación y supervivencia de la célula β , contribuye al control fisiológico de la homeostasis de la masa de célula β . Adaptado de [101].

3.1.6. 6-FOSFOFRUCTO-2-QUINASA-2,6-BISFOSFATASA

Mediante un rastreo a gran escala de péptidos que interaccionaban con la GK, se identificó una secuencia consenso que poseía alta homología con la enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-quinasa-2,6-bisfosfatasa (PF2K-Pasa) [102].

La PF2K-Pasa es responsable de la formación y degradación de fructosa 2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂). El Fru-2,6-P₂ actúa como un potente activador alostérico de la enzima 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1) y como inhibidor de la fructosa-1,6-bisfosfatasa, regulando el flujo de la glucólisis y de la gluconeogénesis [103-105]. La PF2K-Pasa está formada por dos dominios funcionales que confieren capacidad quinasa (PF2K) y bisfosfatasa (PF2Pasa) a la enzima. La síntesis de Fru-2,6-P₂ tiene lugar mediante la fosforilación de fructosa-6-fosfato (F6P) por el dominio PF2K con gasto de ATP, mientras que su degradación se produce como consecuencia de una desfosforilación catalizada por el dominio PF2Pasa, generando así F6P y fósforo inorgánico [106]. Los niveles celulares de Fru-2,6-P₂ son controlados por insulina y glucagón a través de los distintos estados de fosforilación de la PF2K-Pasa. El glucagón induce la fosforilación de la Ser³² activando la PF2Pasa e inhibiendo la actividad PF2K. Por el contrario, la liberación de insulina induce la desfosforilación de la enzima, aumentando la actividad PF2K e inhibiéndose la PF2Pasa [107, 108].

La PF2K-Pasa, interacciona con la GK a través del dominio PF2Pasa en el citoplasma, actuando como un activador endógeno [87]. La unión de la GK a la PF2K-Pasa parece tener un papel fisiológico tanto en célula β como en hepatocitos. La sobreexpresión de la enzima bifuncional en células secretoras de insulina, resulta en un incremento de la actividad enzimática GK mediante el aumento de la velocidad de la reacción, sin afectar a la afinidad y cooperatividad de la enzima por glucosa [87]. La interacción entre ambas proteínas es dependiente de glucosa, viéndose favorecida a concentraciones altas del azúcar [109]. A concentraciones elevadas de glucosa, la PF2K-Pasa se une a la GK en su conformación cerrada (activa). La formación del complejo previene la transición a la conformación super-abierta (inactiva) de la GK. Esta interacción conduce a un incremento en la actividad GK, facilitando el papel de la enzima en la secreción de insulina estimulada por glucosa [87, 108, 109].

También se ha propuesto un papel de la enzima bifuncional en la translocación de la GK desde el núcleo al citoplasma [110]. Se propuso que la localización citoplásmica de la GK podría deberse a la unión con PF2K-Pasa en su estado desfosforilado, la cual actuaría como un receptor citoplásmico para la GK, reteniéndola en

condiciones de alta glucosa [108, 110-112]. Sin embargo, posteriormente se ha observado que el estado de fosforilación de la enzima PF2K-Pasa no afecta a la translocación núcleo-citoplásmica de la GK [113].

3.1.7. PROTEÍNA REGULADORA DE LA GLUCOQUINASA

La GK hepática está regulada mediante interacciones proteína-proteína por la proteína reguladora de la GK (GKRP), proteína de 68 kDa, que actúa como un inhibidor competitivo de su actividad y que además regula la localización núcleo-citoplásmica de la enzima [114, 115].

Dos estudios iniciales, previos al descubrimiento de la GKRP por *Van Schaftingen*, habían sugerido la existencia de un mecanismo inhibitorio de la fosforilación de glucosa en el hígado. En el primero, observaron que en hepatocitos intactos la GK presentaba una afinidad por glucosa menor que en ensayos *in vitro* donde utilizaban enzima purificada [116]. El segundo estudio reveló que la fructosa estimulaba la fosforilación de la glucosa en hepatocitos [117]. En 1989 *Van Schaftingen* identificó en extractos de hígado de rata una proteína que inhibía la actividad GK mediante un mecanismo que era revertido por fructosa-1-fosfato (F1P) [14].

La inhibición de la GK por la GKRP se ve potenciada por F6P y contrarrestada por F1P, fosfato inorgánico e iones Cl^- [84]. F6P y F1P compiten por el mismo sitio de unión en la GKRP y se unen a ella con estequiometría equimolar [118]. Los efectos contrarios de estos dos metabolitos pueden explicarse por el hecho de que F6P y F1P estabilizan dos conformaciones diferentes de la GKRP, pero solamente la estabilizada por F6P posee alta afinidad de interacción por la GK formando un heterodímero para inhibirla [119]. En el hígado, la concentración de F1P aumenta tras la absorción intestinal de la fructosa procedente de la ingesta y su fosforilación por la fructoquinasa hepática. Por otra parte, la inhibición de la GK por la GKRP ligada a F6P podría suponer un mecanismo indirecto de retroalimentación negativa, debido a que el F6P se encuentra en equilibrio con el G6P por la acción de la fosfo-hexosa-isomerasa [120]. Sin embargo, se ha observado que las variaciones de concentración de G6P celulares

debido a la inhibición o sobreexpresión de la glucosa-6-fosfatasa no tienen efecto en la unión de la GK a la GKRP [121, 122].

La GKRP se expresa principalmente en hepatocitos, aunque también se ha demostrado su expresión en el hipotálamo [123, 124]. Sin embargo, existe controversia acerca de si la GKRP regula la actividad GK en células β [123, 125-128]. A pesar de que varios estudios sugieren que el gen *gckr* no se expresa en células β de roedores [125, 126], existen evidencias de que los islotes pancreáticos podrían contener una proteína reguladora de la GK similar a la expresada en el hígado [123, 127]. Sin embargo, contrariamente a lo que ocurre en el hígado, los niveles de expresión de GKRP detectados en páncreas son muy bajos y podrían ser insuficientes para regular los altos niveles de GK expresados en este tejido [128].

Además de actuar como un inhibidor de la GK, se ha demostrado que la GKRP regula la localización núcleo-citoplásmica de la enzima en el hepatocito. En el estado de ayuno o concentraciones de glucosa igual o por debajo de 5 mM, la GK es secuestrada al núcleo acomplejada a la GKRP y en un estado inactivo [129, 130]. En estudios realizados con animales deficientes de GKRP (*gckr* $-/-$) la cantidad basal de GK se encontraba reducida un 50% [125, 131], lo que sugiere que la unión de la GK con su proteína reguladora podría protegerla de la degradación durante los periodos de ayuno, manteniendo un reservorio suficiente y útil de la enzima para afrontar aumentos rápidos de glucemia tras la ingesta de alimento [120, 125]. Fallos en estos mecanismos de regulación producen alteraciones en el metabolismo de la glucosa [131].

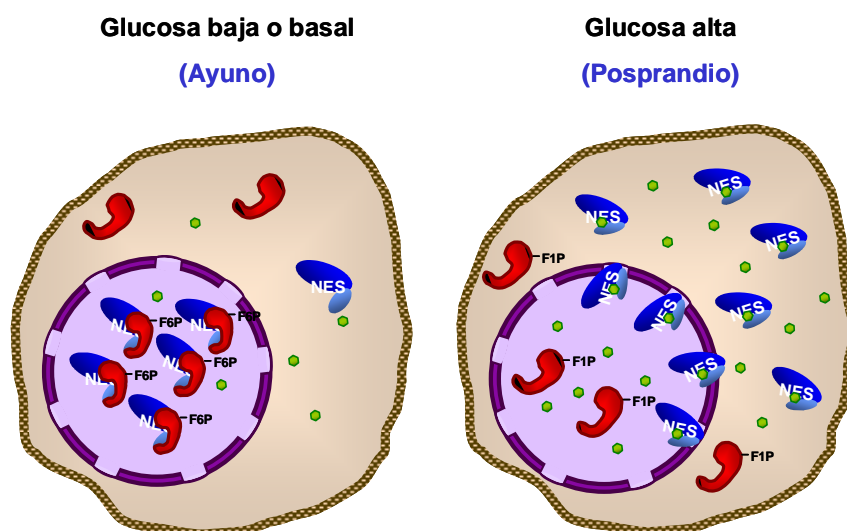


Figura 11. Regulación de la actividad y localización subcelular de la GK por interacción con la GKR. El esquema muestra un hepatocito en situaciones de glucosa basal y a altas concentraciones. El compartimento nuclear (círculo morado) se encuentra en contacto con el citoplasma a través de los poros nucleares. Los óvalos de color azul oscuro y claro representan los dominios mayor y menor de la GK, respectivamente. La proteína GKR se representa en rojo. Debido al aumento de la concentración de glucosa y F1P tras la ingesta, el complejo GKR-GK se disocia, permitiendo que la GK se una a glucosa (representada como un hexágono verde) adoptando la conformación cerrada (catalíticamente activa) y sea exportada al citoplasma gracias a la exposición de la secuencia NES en la enzima. Adaptado de [24].

En términos generales, el transporte activo de proteínas a través de la membrana nuclear depende de la presencia de señales de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*, NLS) o de exportación nuclear (*Nuclear Exportation Signal*, NES). La translocación del heterodímero GK-GKR al núcleo es dirigida por la GKR ya que la GK carece de NLS [115]. Mediante inmunocitoquímica se ha observado que la GKR hepática se localiza mayoritariamente en el núcleo del hepatocito, mientras que la localización subcelular de la GK es dependiente del estado metabólico de la célula [114, 129, 131, 132]. Se ha descrito que la GK se localiza exclusivamente en el citoplasma en hepatocitos de ratones *gckr* $-/-$ [125, 131]. Por el contrario, mediante técnicas de fluorescencia se ha observado que mutaciones que incrementan la afinidad de unión con la GKR favorecen la retención de la enzima en el compartimento nuclear, independientemente de la concentración de glucosa [133, 134].

En el estado posprandial, el reservorio nuclear de la enzima es rápidamente movilizado al citoplasma en respuesta a una concentración elevada de glucosa o fructosa, donde actúa en la utilización de la glucosa hepática y la glucogénesis, para disminuir los niveles de glucosa plasmática. Esta translocación es favorecida además

por precursores de F1P, análogos de glucosa o GKAs (*revisado en [39]*). Se ha propuesto que la translocación de la GK del núcleo al citoplasma viene dada por la disociación del complejo GKRP-GK y el desenmascaramiento de una señal NES, localizada en el dominio mayor de la enzima y que comprende los residuos de aminoácido en posiciones 300 a 310 (Figura 11) [115]. Sin embargo, el mecanismo molecular concreto para la exportación nuclear de la GK no está del todo esclarecido.

4. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA

Debido al papel central que juega la GK en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa en el organismo, mutaciones en el gen *GCK* pueden causar hipoglucemia o hiperglucemia. En humanos, las mutaciones en el gen *GCK* que provocan un aumento en la actividad GK dan lugar a hipoglucemia debido a hiperinsulinismo congénito (HI, OMIM#602485) [17]. Por el contrario, mutaciones en el gen *GCK* que disminuyen la actividad de la enzima producen hipoinsulinemia e hiperglucemia. Las mutaciones inactivantes que aparecen en ambos alelos (en homocigosis o doble heterocigosis) dan lugar a diabetes mellitus neonatal permanente (PNDM, OMIM#606176) [18] y las que se dan en un único alelo causan hiperglucemia familiar o MODY2 (*Maturity Onset Diabetes of the Young 2*; OMIM#125851) [135].

Existe un gran paralelismo entre los efectos causados por las mutaciones en el gen *GCK* en humanos y los observados en modelos animales. Ratones con una deficiencia total del gen *gck* (*gck*^{-/-}) muestran una apariencia normal en el momento del nacimiento, pero mueren a los pocos días como consecuencia de una hiperglucemia severa [136, 137]. Los neonatos *gck*^{-/-} presentan una disminución en el contenido de glucógeno hepático y ausencia de secreción de insulina estimulada por glucosa por parte de la célula β , conllevando unos niveles de glucosa plasmática fuertemente elevados. Pacientes con PNDM que portan mutaciones en ambos alelos del gen *GCK*, presentan una falta de secreción de insulina en respuesta a la hiperglucemia, requiriendo en la mayor parte de los casos aporte insulínico de por vida [8]. Sin embargo, una reducción del 50% en la expresión de la GK en los ratones heterocigotos *gck*^{+/-}

produce hiperglucemia y una alteración en la secreción de insulina estimulada por glucosa similar a la observada en los pacientes MODY2 [136, 138]. Por su parte, la sobreexpresión del gen *gck* en ratones transgénicos incrementa la actividad enzimática y el contenido de proteína GK, la acumulación del glucógeno y disminuye la glucemia plasmática [139, 140]. Además, estos ratones son resistentes a desarrollar hiperglucemia e hiperinsulinemia inducida por dietas ricas en grasas [141].

4.1. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA GLUCOQUINASA HEPÁTICA

La regulación del metabolismo hepático es crucial para mantener la homeostasis de glucosa. En el estado posprandial, el hepatocito capta la glucosa plasmática y la almacena en forma de glucógeno, mientras que en periodos de ayuno, libera glucosa a la circulación a través de la glucogenolisis y la gluconeogénesis. La regulación metabólica entre los dos estados depende de los niveles de glucosa en plasma y de la relación insulina: glucagón [142]. La GK es la isoenzima de HK predominante en los hepatocitos, que contienen el 99% de la GK total expresada en el organismo.

En el hígado, la actividad GK regula o afecta al flujo de distintas vías metabólicas como la glucolisis, la oxidación de glucosa, la vía de las pentosas fosfato, la síntesis de glucógeno, la glucogenolisis, la gluconeogénesis y la síntesis de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. El transporte de glucosa al interior de las células hepáticas es facilitado por el transportador de glucosa de tipo 2 (GLUT-2), el cual presenta una alta capacidad y muy baja afinidad por glucosa, permitiendo un rápido equilibrio entre la concentración de glucosa a ambos lados de la membrana, independientemente de la acción de la insulina [143]. El transporte ilimitado de este monosacárido al interior del hepatocito y las características particulares de la GK permiten que fluctuaciones en la glucemia plasmática se traduzcan rápidamente en cambios en la velocidad de fosforilación de glucosa en el hepatocito. Este G6P formado puede participar como sustrato en varias vías. En la glucolisis, el G6P se convierte en piruvato y posteriormente éste en la mitocondria en acetil-CoA, que sirve como sustrato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos de donde se obtiene citrato, activador de la síntesis lipídica. Por otra parte, el G6P puede ser oxidado a través de la vía de las pentosas

fosfato, hasta obtener NADPH y ribulosa-5-fosfato, necesarios para la síntesis de macromoléculas. En la síntesis de glucógeno, el G6P es convertido a UDP-glucosa, la cual es sustrato de la glucógeno sintasa. Además, el G6P actúa como un activador alostérico de esta enzima y facilita la inactivación de la glucógeno fosforilasa [144, 145]. La sobreexpresión del gen *gck* en hepatocitos aislados, mediante transferencia génica con adenovirus, ha mostrado un incremento en la síntesis de glucógeno, en la glucólisis y en la oxidación de glucosa, proporcional al aumento en actividad GK [146, 147]. El hecho de que la GK ejerza un control sobre la síntesis de glucógeno y la glucólisis confiere a los hepatocitos la capacidad de regular el metabolismo de glucosa en respuesta a fluctuaciones en la glucemia plasmática.

Puesto que la expresión de la isoforma hepática de la GK está regulada principalmente por insulina, un incremento en la relación insulina: glucagón se encuentra fisiológicamente asociado con un incremento en la GK hepática, además de una menor inhibición por GKRP ya que los niveles de glucosa y de F1P se encuentran elevados.

Para determinar la importancia de la actividad GK hepática en la regulación de la homeostasis de glucosa en el organismo, se han desarrollado distintos modelos animales. Se generó una línea de ratones donde se inactivó el gen *gck* específicamente en el hígado, mediante el sistema Cre-LoxP [137]. En contraste con la letalidad perinatal observada en ratones con ausencia total de GK, la supresión de la GK hepática no causa la muerte del animal. Los ratones homocigotos para la delección de la isoforma hepática de GK muestran, en el estado normal de alimentación, una leve y constante hiperglucemia con relativa hiperinsulinemia, indicando resistencia insulínica [137]. Sin embargo, estudios de *clamp* hiperglucémico y basal permitieron observar claros efectos producidos por la ausencia de la GK hepática. Los niveles de glucosa en sangre eran un 40% superiores en el estudio basal, sin apreciarse diferencias en los niveles de insulina. En hiperglucemia, la síntesis de glucógeno y la secreción de insulina estaban disminuidas en un 90 y 70%, respectivamente, demostrándose así que la GK hepática contribuye a la homeostasis de glucosa, determinando la velocidad de utilización de glucosa por el hígado. La hiperglucemia causada por la falta de

GK hepática disminuía la secreción de insulina inducida por glucosa, reflejando un daño funcional de las células β debido a la hiperglucemia crónica y sobreestimulación secretora [137]. Por otra parte, se diseñaron dos líneas de ratones transgénicos que sobreexpresaban el gen *gck* de forma estable en tejido hepático [148, 149]. Estos ratones mostraban tan sólo un pequeño incremento en el contenido de la GK hepática pero, sin embargo, suficiente para disminuir los niveles tanto de glucosa como de insulina plasmática. Ninguna de estas dos líneas transgénicas presentaba hipertrigliceridemia, contrariamente a lo observado en ratas que expresaban niveles de GK hepática mucho mayores utilizando adenovirus recombinantes [150]. Por otra parte, la sobreexpresión de *gck* mediante adenovirus recombinantes, en un modelo de ratones diabéticos, conseguía normalizar los niveles de glucosa plasmática y disminuir los niveles de insulina tras una dieta rica en lípidos [151].

4.2. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA GLUCOQUINASA EN LA CÉLULA β PANCREÁTICA

Las células β pancreáticas son las encargadas de sintetizar y secretar insulina en función de las fluctuaciones en la glucemia plasmática, participando así en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa. La GK es considerada la molécula sensor de glucosa en estas células [23].

Del mismo modo que en los hepatocitos, el transporte de glucosa al interior de las células β pancreáticas es mediado por el transportador GLUT-2, permitiendo un rápido equilibrio entre la concentración de glucosa plasmática y la intracelular [152, 153]. La reacción de fosforilación de la glucosa es predominantemente catalizada por la GK [154]. Las características bioquímicas de esta enzima son tales que las concentraciones fisiológicas de glucosa en sangre, entre 4 y 10 mM, pueden determinar la tasa de metabolismo de glucosa en la célula β . Además, estas células prácticamente carecen de maquinaria de síntesis y degradación de glucógeno, con lo que la tasa de glucólisis está determinada por las concentraciones intracelulares de glucosa, el contenido de GK y la concentración del segundo sustrato, ATP, que es generalmente saturante. Este diseño bioquímico permite a la glucosa dirigir y regular el metabolismo

intermediario de la célula β y la generación de factores que acoplen el metabolismo a la síntesis y secreción de insulina, con una fuerza de control próxima a la unidad [155]. El piruvato generado en la glucólisis va a ser principalmente metabolizado en la célula β por dos enzimas mitocondriales, la piruvato deshidrogenasa y la piruvato carboxilasa. Estas dos reacciones, que regulan la generación de ATP y la anaplerosis del ciclo de Krebs, respectivamente, son cruciales para el proceso de secreción de insulina estimulado por glucosa. Un incremento en la relación ATP/ADP+P_i intracelular causa el cierre de los canales de K⁺ dependientes de ATP en la membrana plasmática, causando la despolarización de la membrana y la apertura de los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje. El incremento de la concentración citosólica de iones Ca²⁺ promueve la exocitosis de los gránulos de insulina y la consecuente secreción de la hormona (Figura 12). A pesar de que la glucosa es el estímulo fisiológico más importante, la célula β puede liberar insulina en respuesta a otros estímulos, como aminoácidos, cetoácidos y ácidos grasos.

Se han generado distintos modelos animales para analizar la importancia de la actividad GK de la célula β en la homeostasis de glucosa del organismo. En el primer modelo se deleccionaba el exón 1a, responsable de la expresión de la isoforma neuroendocrina, mientras que se mantenían niveles normales de expresión de la isoforma hepática. Estos ratones mostraban un fenotipo similar al mostrado por ratones con supresión global del gen *gck*, desarrollando diabetes severa debido a un profundo defecto en la secreción de insulina y muriendo durante la primera semana de vida [156]. Postic y cols en 1999 generaron un modelo de ratón donde se deleccionaba el gen *gck* específicamente en las células β mediante el sistema Cre-LoxP. Estos ratones presentan un fenotipo similar al mostrado por ratones con supresión para el exón 1a y con supresión global del gen *gck*. Los ratones homocigotos (*gck* ^{-/-} específicos para la isoforma de célula β) muestran esteatosis, agotamiento de los almacenes de glucógeno hepático y una fuerte disminución en los niveles de insulina en plasma. Estos ratones mueren a los pocos días tras su nacimiento como resultado de una diabetes severa [137]. Sin embargo, la delección de una sola copia del gen *gck* en células β resulta en un fenotipo menos severo, caracterizado por una leve hiperglucemia en ayunas y una disminución en la secreción de insulina [137]. Recientemente, se ha demostra-

do que la supresión específica del gen *gck* en célula β en ratones adultos produce hiperglucemia severa debido a la imposibilidad de estos ratones de secretar insulina. Además, también mostraban disminución de la proliferación y aumento de la apoptosis de células β . Contrariamente, el tratamiento de ratones con GKAs aumenta la proliferación de las células β [157]. En conjunto, estos hechos demostraban la importancia de la GK pancreática como reguladora de la secreción de insulina, la proliferación de la célula β y la supervivencia.

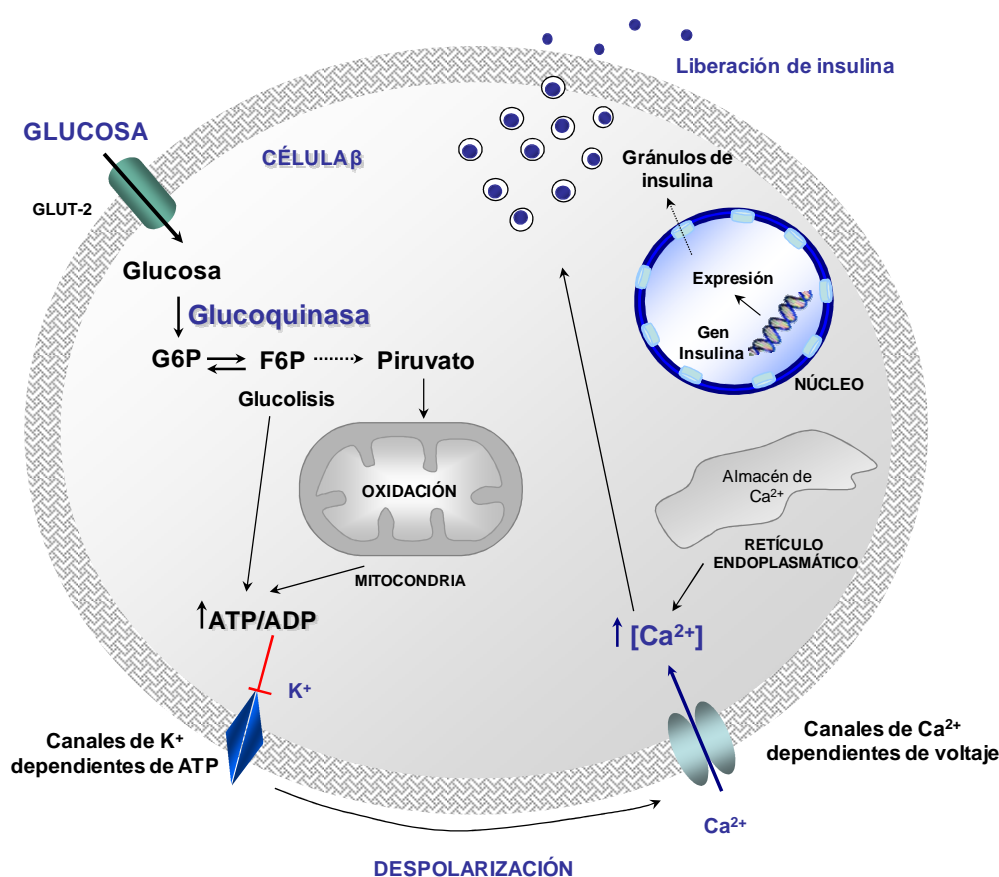


Figura 12. Modelo de célula β donde se muestra esquemáticamente el proceso de secreción de insulina. La glucosa, una vez transportada por GLUT-2 al interior de la célula, es fosforilada por la glucoquinasa. La consiguiente producción de piruvato y su oxidación en la mitocondria incrementará la relación ATP/ADP, lo que cerrará los canales de potasio dependientes de ATP, que a su vez despolarizará la membrana, dando lugar a la entrada de Ca^{2+} extracelular, lo cual causará la fusión de los gránulos secretores de insulina con la membrana plasmática y la liberación de insulina a la circulación. Adaptado de [158].

4.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA GLUCOQUINASA EN OTRAS CÉLULAS DEL EJE NEUROENDOCRINO

Se ha propuesto que la GK actúa como un sensor de glucosa en neuronas hipotalámicas de un modo similar a la célula β pancreática [159, 160]. Respecto a las células α existe controversia. Mientras que algún estudio revela que la glucosa ejerce un efecto indirecto sobre la secreción de glucagón mediado por insulina, somatostatina, Zn^{2+} y ácido gamma amino-butírico (GABA) [161], existen estudios que postulan un efecto directo inhibitorio de la glucosa sobre la secreción de glucagón, sugiriendo que la GK juega un papel en la liberación de esta hormona [162-165]. También se ha propuesto un papel de la GK en glándulas gonadotropas [166, 167]. Las gonadotropinas son hormonas que regulan la fertilidad mediante la regulación de la producción de hormonas sexuales y del crecimiento y maduración de los oocitos. Se ha postulado que la glucosa regula la liberación de estas hormonas a nivel de la glándula pituitaria, con la GK actuando como un sensor local de glucosa [155].

5. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA GLUCOQUINASA MUTADA

5.1. HIPOGLUCEMIA ASOCIADA A MUTACIONES EN EL GEN GCK: HIPERINSULINISMO CONGÉNITO (HI)

El HI se caracteriza por una inapropiada secreción de insulina por parte de la célula β pancreática respecto a los niveles de glucemia existentes, dando lugar a hipoglucemia. Aunque de carácter heterogéneo, su base fisiopatológica es un fallo en la supresión de la insulina por parte de la célula β durante la hipoglucemia [168]. Es importante el diagnóstico temprano y adecuado de esta enfermedad, debido a que los pacientes corren el riesgo de presentar una lesión cerebral permanente debido a la hipoglucemia continua y recurrente. De todos los casos descritos de HI, se conocen las causas genéticas en al menos el 50% de ellos. El 40-45% corresponde a mutaciones producidas en los genes *ABCC8* y *KCNJ11* que codifican para las subunidades formadoras de los canales de K^+ sensibles a ATP, SUR1 y Kir6.2, respectivamente [169, 170], mientras que el 5-10% restante corresponden a mutaciones en el gen GCK [17],

de las enzimas mitocondriales glutamato deshidrogenasa (*GLUD1*) [171] y L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (*HADH*) [172], el receptor de la insulina (*INSR*) [173], el factor nuclear hepatocítico 4 α (*HNF4A*) [174], el promotor del gen del transportador monocarboxilato 1 (*SLC16A1*) [175] y en la proteína mitocondrial desacoplante 2 (*UCP2*) [176]. Se desconoce aún la causa genética del 45-55% de los casos descritos [177]. La presentación clínica es heterogénea, dependiendo de la severidad de la hipoglucemia y de la edad del paciente, abarcando desde una hipoglucemia asintomática detectada en controles rutinarios a una hipoglucemia severa causante de episodios epilépticos y coma. En HI, los niveles de glucosa plasmática pueden incrementarse con el tratamiento con glucagón para estimular la glucogenolisis, con diazóxidos para abrir los canales de K⁺ dependientes de ATP inhibiendo la secreción de insulina o con análogos de somatostatina [178-180].

El HI asociado al gen *GCK* es causado por mutaciones que activan a la enzima por producir un incremento en la afinidad de ésta por la glucosa, disminuyendo el umbral de glucosa para la secreción de insulina y por tanto una secreción anómala de insulina a bajos niveles de glucosa [8]. Desde que en 1998 *Glaser y cols* describieron el primer caso de HI debido a una mutación activadora de carácter heterocigótico en el gen *GCK* (p.Val455Met) [17], otras catorce mutaciones activadoras se han identificado como causa de hipoglucemia debida a hiperinsulinismo: p.Ser64Tyr [181], p.Thr65Ile [182], p.Gly68Val [183], p.Val91Leu [184], p.Trp99Arg [182], p.Trp99Leu [185], p.Thr103Ser [186], p.Met197Ile [185], p.Tyr214Cys [187], p.Val389Leu [186], p.Glu442Lys [188], p.Val452Leu [189], p.Ala454dup [185], p.Ala456Val [190]. Todos los residuos afectados en estas mutaciones, a excepción de Met¹⁹⁷ y Val³⁸⁹, se agrupan en el sitio alostérico de la GK.

El fenotipo clínico que presentan los pacientes con mutaciones activadoras de la GK abarca un amplio espectro, desde una leve hipoglucemia asintomática hasta una pérdida de consciencia y convulsiones. Se han observado diferencias en la edad del diagnóstico, el peso en el nacimiento y los valores de insulina y de glucosa plasmática entre familias con distintas mutaciones pero también entre miembros de una misma familia, portadores de la misma mutación [183, 185, 189]. La mayoría de

las mutaciones activadoras identificadas en el gen *GCK* producen una hipoglucemia que responde tanto a cambios en la dieta como a tratamiento farmacológico con diazóxidos [17, 182, 183, 185, 189, 190], aunque también se han identificado otras mutaciones que producen una hipoglucemia severa, que no responde a terapia con diazóxidos y que es refractaria incluso al tratamiento quirúrgico mediante pancreatometomía parcial [184, 185, 187]. En algunos de estos casos, como los asociados a las mutaciones p.Tyr214Cys y p.Val91Leu, tras el examen histológico del tejido pancreático extraído, se observó que los islotes eran anormalmente grandes [184, 187], incluso que la célula β poseía núcleos agrandados y que había evidencias de incremento en la proliferación de este tipo celular [184].

5.2. HIPERGLUCEMIA ASOCIADA A MUTACIONES EN EL GEN *GCK*

5.2.1. DIABETES MELLITUS NEONATAL PERMANENTE (PNDM)

La PNDM es una forma rara de diabetes diagnosticada en los primeros meses de vida [191]. Se caracteriza por un bajo peso del feto en el nacimiento y diabetes severa que no presenta remisión, necesitando tratamiento con insulina desde los primeros días de vida [18]. Las principales causas de PNDM son mutaciones en los genes *ABCC8* y *KCNJ11* y mutaciones en el gen de la insulina (*INS*) [8]. Los pacientes portadores de mutaciones en los genes *ABCC8* y *KCNJ11* mejoran los niveles de glucemia mediante el tratamiento con sulfonilureas.

Mutaciones en ambos alelos del gen *GCK*, bien homocigotas o dobles heterocigotas que causan déficit de actividad GK, producen una forma rara de diabetes neonatal permanente [8]. Los primeros casos de PNDM causados por deficiencia de GK fueron publicados por *Njolstad y cols* en 2001. Los autores describieron dos pacientes de origen noruego e italiano que presentaban retraso en el crecimiento uterino y grave hiperglucemia tras el nacimiento, que requería aporte de insulina para su control [18]. Estos pacientes mostraban una falta de secreción de insulina en respuesta a la hiperglucemia y eran portadores de las mutaciones homocigotas p.Met210Lys y p.Thr228Met, respectivamente. El estudio familiar determinó que los padres, en am-

bos casos, eran heterocigotos para las mutaciones y presentaban leve hiperglucemia e intolerancia a la glucosa. Posteriormente se describieron otros tres pacientes con características similares a los anteriores [192]. Uno de ellos era homocigoto para la mutación p.Ala378Val [192]. El segundo lo era para una mutación en una secuencia consenso para el procesamiento del mRNA [IVS8] + 2T → G y el tercero era doble heterocigoto para las mutaciones p.Gly264Ser e IVS8 + 2T → G. Posteriormente se han identificado otros nuevos casos de PNDM causados por mutaciones en el gen GCK: p.Arg397Leu [193], p.Thr168Ala [194], p.Tyr61X [195], p.Gln98X [196], p.Gly261Arg [196]. Aunque todos los casos descritos presentaban un bajo peso al nacer y requerimiento de aporte insulínico a los pocos días del nacimiento, la gravedad de la diabetes podría depender de la severidad funcional de la mutación. Así, casos que resultan de un efecto más leve producido por la mutación, como en el caso de p.Arg397Leu, resulta en un fenotipo menos grave [197]. Aunque el tratamiento principal en los casos de PNDM asociada a GK es la insulina, existen dos estudios que muestran una mejora clínica inicial tras el tratamiento adicional con sulfonilureas [194, 196].

5.2.2. HIPERGLUCEMIA FAMILIAR (MODY2)

Mutaciones heterocigotas en el gen GCK se asociaron por primera vez con diabetes MODY2 tras el análisis de ligamiento genético realizado con familias diabéticas de origen europeo [15, 16]. MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) es un tipo de diabetes monogénica clínica y genéticamente heterogéneo de herencia autosómica y dominante que en general se manifiesta antes de los 25 años de edad [198]. El subtipo MODY2, actualmente denominado MODY asociado a GCK (MODY-GCK) o “hiperglucemia familiar” [199], es un tipo frecuente de diabetes monogénica [8]. Los pacientes MODY2 presentan un fenotipo clínico bastante homogéneo. Las alteraciones metabólicas del tipo MODY2 están presentes desde el nacimiento, aunque a menudo se diagnostican en edades posteriores durante controles rutinarios debido a su carácter asintomático. Estas alteraciones suelen ser leves y no precisan, en general, tratamiento farmacológico, controlándose con dieta y ejercicio y siendo la incidencia de complicaciones muy baja [8]. La hiperglucemia aparece como resultado de una re-

ducción en la sensibilidad de las células β a la glucosa [200]. Debido a la inactivación parcial de la GK, los sujetos MODY2 presentan un umbral de glucosa para la estimulación de insulina más elevado de lo normal (entre 5.5 y 8 mM), lo que lleva a un incremento de la glucemia basal y posprandial [8] (Figura 13A). Las curvas dosis-respuesta para la secreción de insulina dependiente de glucosa realizadas en pacientes MODY2 se encuentran desplazadas hacia la derecha (Figura 13B). Además del defecto en la secreción de insulina, los pacientes MODY2 presentan un defecto en la síntesis de glucógeno y un aumento de la gluconeogénesis tras la ingesta [201]. La base del diagnóstico de los pacientes MODY2 es una hiperglucemia leve en ayunas que apenas empeora con la edad, sin observarse un deterioro de la célula β [202]. Mecanismos compensatorios que operan *in vivo* debido a una adaptación fisiológica en las células β , como la compensación de la falta de actividad GK del alelo mutante con la del alelo silvestre, limitan la severidad del efecto secretorio y, por tanto, el grado de hiperglucemia observado en el transcurso de la enfermedad.

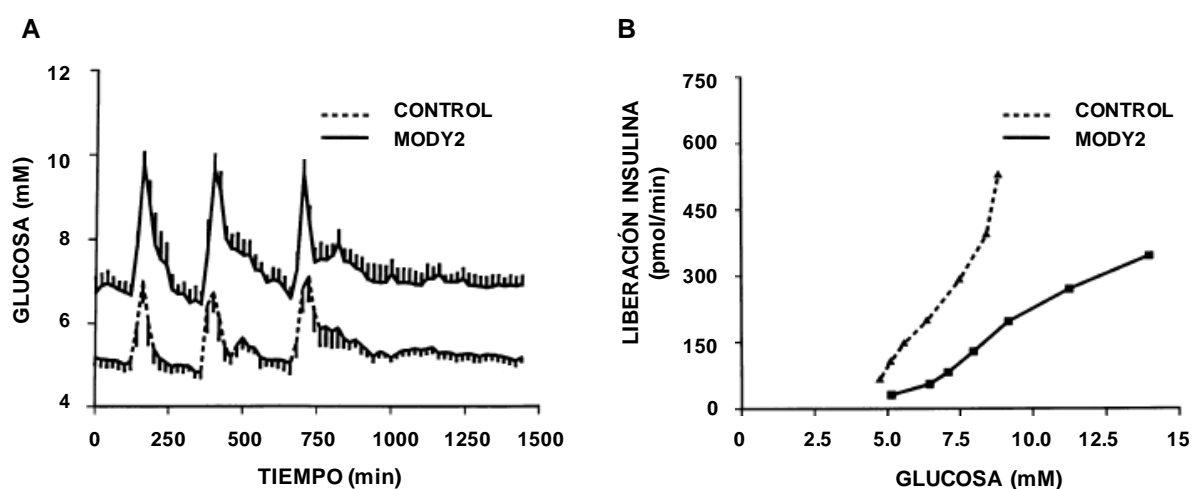


Figura 13. A. Perfil de glucemia plasmática en función del tiempo para sujetos MODY2 e individuos no diabéticos (control). Los picos de máxima concentración de glucosa en plasma corresponden a las tres comidas del día (desayuno, comida y cena). Los individuos con mutaciones en el gen GCK presentan una hiperglucemia a lo largo del tiempo respecto de los individuos control. **B. Relación entre concentración de glucosa y secreción de insulina en individuos control y portadores de mutaciones MODY2.** El umbral de glucosa necesario para la secreción de insulina es mayor en los pacientes que portan mutaciones en el gen GCK que en los individuos control [200].

A menudo la diabetes MODY2 se detecta en controles realizados durante el embarazo. Cerca del 50% de las mujeres portadoras de mutaciones en el gen GCK son diagnosticadas de diabetes gestacional [203, 204]. Cuando el feto no ha heredado la

mutación de la madre MODY2, éste responde a la hiperglucemia materna con una producción excesiva de insulina, pudiendo presentar macrosomía. En este caso la hiperglucemia materna deberá controlarse con agentes hipoglucemiantes o insulina [204, 205]. En el caso contrario, cuando la madre no es portadora de una mutación GCK pero si el feto, se observa una reducción del crecimiento fetal y en el peso al nacimiento, lo que demuestra la influencia que los cambios en la secreción de insulina pueden tener en el crecimiento intrauterino.

6. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS GLUCOQUINASAS MUTADAS

La caracterización funcional de las mutaciones que afectan a la actividad GK ha contribuido a conocer mejor los mecanismos por los cuales la GK actúa como un sensor de glucosa integrando los niveles de glucemia con la secreción de insulina.

Desde que en 1992 se describió la primera mutación en el gen GCK [15], se han descrito más de 600 mutaciones implicadas en las distintas patologías asociadas a esta enzima. Las mutaciones están localizadas a lo largo del promotor y de los diez exones del gen expresados en la isoforma pancreática (Figura 14). Se han identificado mutaciones sin sentido, mutaciones que dan lugar a un cambio de aminoácido, mutaciones que alteran los lugares implicados en el procesamiento de intrones y mutaciones que alteran el marco de lectura debido a deleciones e inserciones [8].

Las mutaciones asociadas a hipoglucemia incrementan la afinidad de la GK por la glucosa y en su mayoría afectan a residuos localizados en el sitio alostérico de la enzima [8]. En cambio, los residuos afectados por las mutaciones que causan diabetes se distribuyen por toda la estructura proteica. La mayoría de estas mutaciones inactivan a la enzima afectando a uno o varios de sus parámetros cinéticos. Los efectos más frecuentes son la disminución de afinidad por uno o ambos sustratos, a menudo en combinación con una reducción en la constante catalítica (K_{cat}). Estos defectos, en su conjunto, se traducen en una bajada del índice de actividad y en un incremento del umbral de glucosa para la liberación de insulina [206].

En algunos casos, la hiperglucemia que presentan los pacientes MODY2 no puede ser explicada por la afectación de los parámetros cinéticos de la GK. Se han descrito mutaciones que no causan un defecto en la actividad de la enzima, mostrando parámetros cinéticos aparentemente normales o incluso una afinidad de la GK por la glucosa levemente incrementada. En estos casos otros mecanismos pueden causar alteraciones en la homeostasis de glucosa, tal como defectos en la estabilidad proteica de la GK [197, 207-209].

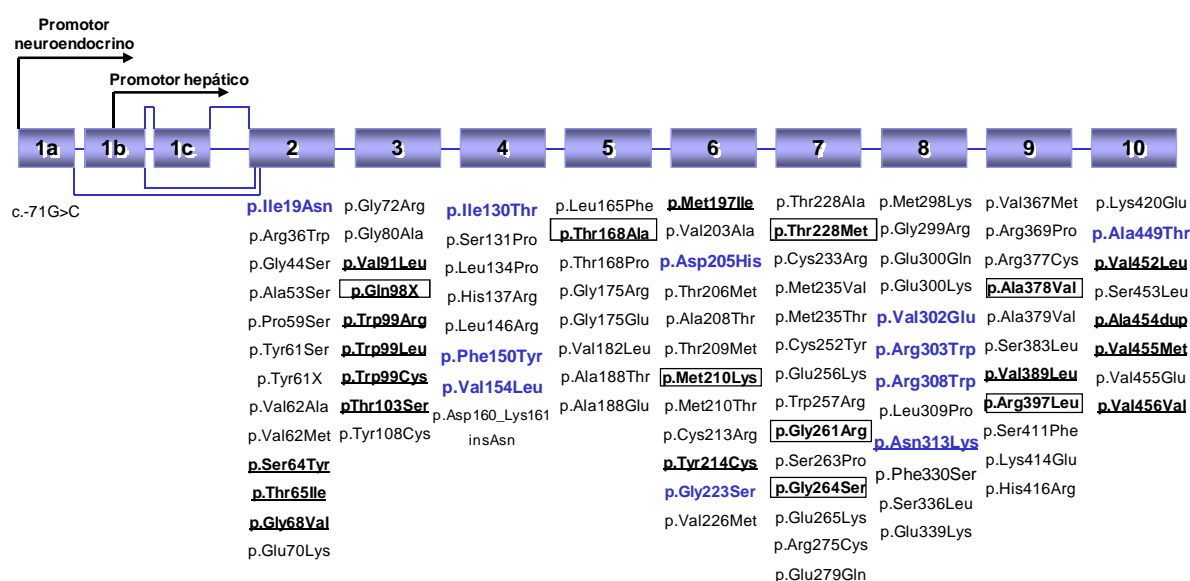


Figura 14. Mutaciones en el gen GCK, identificadas en pacientes con MODY2, PNDM y HI, que han sido caracterizadas funcionalmente. La organización génica exón-intrón se muestra aquí representada por cajas y líneas. Las flechas sobre los exones 1a y 1b indican el inicio de la transcripción a partir del promotor neuroendocrino y hepático, respectivamente. Se indican las mutaciones causantes de HI (subrayadas y en negrita) y las implicadas en PNDM (marcadas con un cuadro). Las mutaciones caracterizadas funcionalmente a lo largo de este trabajo se indican en azul.

El control ejercido por la GK sobre la función de la célula β se ilustra por el impacto de las mutaciones en el gen GCK sobre el umbral de glucosa necesario para la secreción de insulina. Se considera que el umbral fisiológico es de 5 mM. Sin embargo, este umbral se ve disminuido en pacientes que portan mutaciones activadoras e incrementado en el caso de mutaciones inactivantes. A partir de la caracterización funcional *in vitro* de mutaciones implicadas en los distintos síndromes glucémicos, el grupo de F. Matschinsky desarrolló un modelo matemático que relaciona el índice de actividad obtenido con el umbral de glucosa necesario para la secreción de insulina [59] (Figura 15).

$$I_a = \frac{[ATP]}{[ATP] + K_m} \cdot \frac{K_{cat}}{S_{0.5}^h} \left(s^{-1} \cdot \frac{1}{mmol^h} \right)$$

$$\frac{BGPR}{2GCKB^w K_{cat} E^w S^w} = \frac{G^{hw}}{G^{hw} + S_{0.5}^{whw}} \cdot \frac{2.5}{2.5 + K_m^w}$$

Figura 15. Expresiones que definen el índice de actividad de la GK (I_a) y la capacidad de fosforilación de glucosa en la célula β (BGPR). La capacidad de fosforilación de la glucosa en la célula β (BGPR) se expresa en términos de mol de glucosa por gramo de tejido pancreático por segundo (mol/g tejido/s) y viene definido por los parámetros cinéticos de la GK silvestre. A concentraciones de glucosa correspondientes al umbral necesario para la secreción de insulina, la BGPR alcanza el 28% de la capacidad normal. El contenido basal de GK de la célula β (GCKB) se define como la unidad y se expresa en mol/g. S y E son los coeficientes de estabilidad y de expresión de la enzima, respectivamente. S expresa la estabilidad de la proteína mutante en términos relativos a la proteína silvestre. E considera el efecto de la glucemia sobre la expresión del gen GCK, permitiendo una compensación del alelo silvestre sobre el mutante. Se considera $E = (G^h \times 2) / (G^h + S_{0.5}^h)$ donde G se refiere a la concentración de glucosa (mM) en el umbral necesario para la secreción, h es el coeficiente de Hill que determina la cooperatividad por glucosa, el valor de 2 indica que la inducción media máxima se alcanza a la concentración de glucosa correspondiente con el valor de la $S_{0.5}$ y $S_{0.5}$ se refiere a la concentración de glucosa necesaria para lograr la tasa media de fosforilación. Para el silvestre, se considera $E = 0.66$ a 5 mM de glucosa [59].

Pequeños cambios en los parámetros cinéticos pueden producir efectos profundos en el umbral de glucosa necesario para la secreción de insulina y en la glucemia plasmática. Así, un incremento en el índice de actividad de la GK supone un aumento del metabolismo de la glucosa y una disminución en el umbral de glucosa. Por el contrario, una disminución en el índice de actividad de la enzima se encuentra asociado con una disminución en el metabolismo de la glucosa y con un incremento en el umbral de glucosa necesario para la secreción de insulina [210] (Figura 16).

Se han descrito mutaciones identificadas en familias de pacientes que no parecen afectar a la actividad cinética ni a la estabilidad de la GK *in vitro*, lo cual ha hecho pensar que ciertas mutaciones estuvieran afectando a otros mecanismos de regulación de la actividad GK *in vivo*, reflejando la complejidad en los mecanismos de regulación de la GK y conllevando alteraciones en el control de la homeostasis de glucosa. En efecto, se han identificado mutaciones que afectan a la interacción de la GK con otras proteínas asociadas o por activadores alostéricos [97, 133, 134, 186, 197, 209, 211-214].

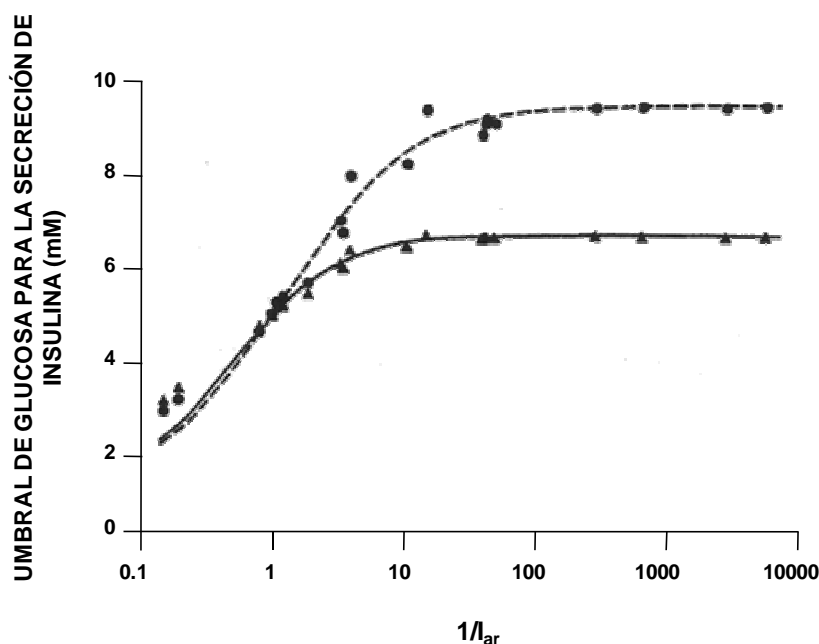


Figura 16. Relación entre el índice de actividad relativo (I_{ar}) de las enzimas silvestre y mutantes y el umbral de glucosa necesario para la secreción de insulina. Un I_{ar} próximo a la unidad corresponde con un umbral de glucosa de aproximadamente 5 mM, acorde con el modelo matemático propuesto en [59]. La línea continua considera la adaptación de la célula β a una situación persistente de hiperglucemia, que produce un incremento en la actividad GK por aumento en la expresión del alelo normal. La línea discontinua corresponde a la situación teórica sin considerar la adaptación de la célula β . Adaptado de [206].

7. LA GLUCOQUINASA COMO DIANA PARA EL DESARROLLO DE NUEVAS TERAPIAS ANTIDIABÉTICAS

Enzimas que ejercen un control fuerte sobre la homeostasis de glucosa en el organismo pueden ser consideradas dianas para el desarrollo de fármacos antidiabéticos. En este sentido, la glucoquinasa es un buen candidato por su gran impacto sobre la homeostasis de glucosa debido a su papel como sensor de glucosa en la célula β y al control del metabolismo de la glucosa en el hígado [155].

Inicialmente, el diseño de moléculas activadoras de la GK se dirigió hacia compuestos que mimetizaran el efecto del F1P suprimiendo la acción inhibitoria de la GKRP sobre la GK [19]. El resultado de ese estudio culminó con la identificación de los primeros GKAs, pequeñas moléculas que activaban directamente a la enzima, incrementando su afinidad por glucosa y su constante catalítica, sin afectar a la GKRP [19, 20]. El análisis estructural de la GK cristalizada demostró que estos GKAs se unían al sitio alostérico de la GK, descubierto como resultado de los estudios bio-

químicos de mutaciones activadoras causantes de hipoglucemia por hiperinsulinismo [19, 20]. Desde que en el año 2003 se describió el primer compuesto con efecto activador de la enzima [19], se han descrito más de 100 moléculas con dicho efecto (*revisado en* [9]). Estos GKAs, poseen una gran variedad de estructuras (Figura 17), con un carbono o un anillo aromático central con tres sustituyentes, dos de los cuales son de carácter hidrofóbico y al menos uno de ellos aromático. Los GKAs simulan el efecto de las mutaciones activadoras identificadas en los pacientes con HI. Todos los activadores aumentan la afinidad de la enzima por glucosa, aunque el efecto sobre la constante catalítica, la cooperatividad por glucosa y la afinidad por ATP puede variar de unos compuestos a otros. Los GKAs sólo pueden unirse a la GK en presencia de glucosa, ya que el sitio de unión al activador solamente se encuentra accesible en la conformación cerrada y muchos de estos compuestos interfieren en la inhibición de la GK por la GKRP [155, 215].

Estudios realizados con hepatocitos aislados de rata han mostrado que los GKAs estimulan la glucólisis y la síntesis de glucógeno [216]. En animales sanos y modelos de diabetes mellitus tipo 2, los GKAs disminuyen los niveles de glucosa en sangre y estimulan la secreción de insulina, a la vez que reducen la producción hepática de glucosa [19, 155, 217-221]. Ensayos clínicos, realizados con individuos sanos y con pacientes diabéticos tipo 2, muestran que estos compuestos pueden reducir los niveles de glucosa plasmática e incrementar la secreción de insulina en ambos grupos, aunque también se ha observado una hipoglucemia moderada a dosis altas de activador [21, 222-224].

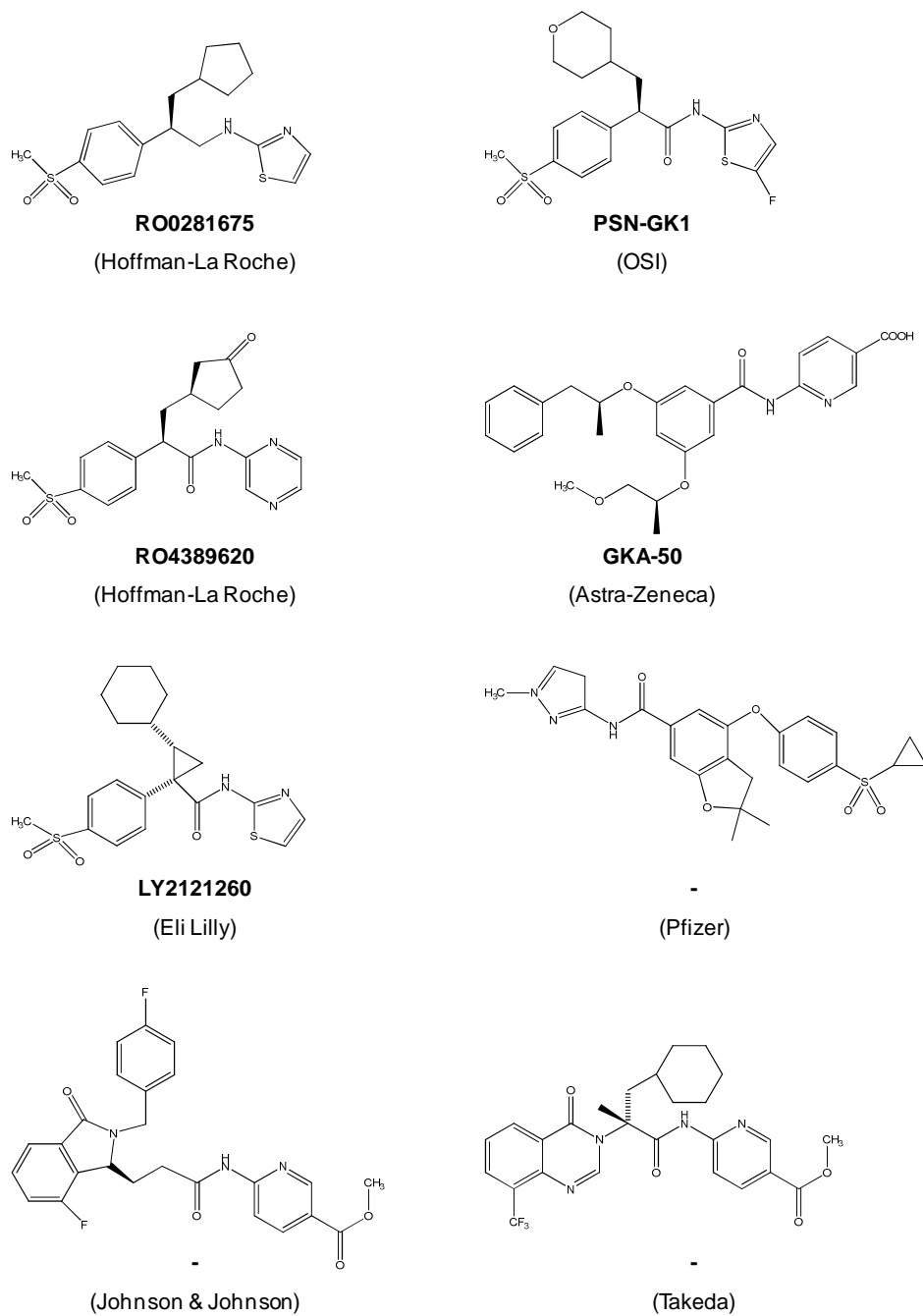


Figura 17. Estructura química de algunos GKAs patentados. Bajo la estructura se indica el nombre comercial del compuesto y la empresa farmacéutica encargada de su patente.

Recientemente, *Beer y cols* han sugerido la existencia de otras regiones proteicas de la GK, distintas al sitio alostérico, que están implicadas en la regulación de la enzima, tras identificar y caracterizar funcionalmente sendas mutaciones MODY2 y HI que afectan a un mismo residuo localizado en el dominio mayor de la enzima [186]. La ampliación de conocimientos acerca de la regulación de la enzima puede abrir nuevas vías para la manipulación farmacológica de la actividad GK que pueda ser aplicada en el tratamiento de la diabetes u otras alteraciones en el metabolismo de la glucosa.

A lo largo de este trabajo de investigación se han analizado algunos de los principales mecanismos de regulación de la glucoquinasa mediante la caracterización funcional de ciertas mutaciones identificadas en pacientes. Hemos estudiado el efecto de las mutaciones sobre los parámetros cinéticos de la enzima, en su estabilidad proteica, en la interacción con proteínas asociadas y sobre su localización subcelular.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el de profundizar en la regulación de la GK humana, a partir de la caracterización funcional de un grupo de mutaciones identificadas en pacientes con alteraciones en la homeostasis de glucosa. Concretamente:

1. Analizar el defecto causado por las distintas mutaciones en la estructura proteica y en la cinética enzimática.
2. Analizar la interacción de la glucoquinasa con las proteínas GKAP/DUSP12, BAD, PF2K-Pasa y GKRP, determinando el posible efecto causado por las mutaciones.
3. Analizar el mecanismo de exportación nuclear de la glucoquinasa, determinando el posible efecto de mutaciones localizadas en la señal de exportación NES.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. PLÁSMIDOS

· **pGEX5X.2-GCK silvestre y mutantes:** El plásmido pGEX5X.2-GCK contiene el cDNA de la isoforma pancreática de la GK humana fusionado a la glutation-S-transferasa (GST) [123].

Las mutaciones en el gen GCK analizadas en este trabajo fueron introducidas en este plásmido por mutagénesis dirigida mediante PCR con el kit *Quick Change* (Stratagene) y utilizando oligonucleótidos específicamente diseñados que contenían la mutación en la secuencia nucleotídica, descritos en la Tabla 3. Los plásmidos portadores de las mutaciones p.Ile19Asn, p.Ile130Thr, p.Asp205His, p.Gly223Ser, p.Val302Glu, p.Arg308Trp, p.Asn313Lys, p.His416Arg, p.Ala449Thr y p.Ala456Val fueron seleccionados por análisis de restricción con las enzimas PvuII, ApaI, NcoI, NsiI, XhoI, SacI, HindIII, HindIII, XmaIII y StuI, respectivamente y posterior secuenciación.

· **pACT2-GCK silvestre y mutantes:** contienen el cDNA de la isoforma pancreática de la GK humana o de cada uno de sus mutantes, fusionado al dominio de activación de Gal4 de *S. cerevisiae*. Los cDNA se extrajeron de los correspondientes pGEX5X.2-GCK silvestre y mutantes con las enzimas BamHI y XhoI y se clonaron en el vector pACT2 (Clontech) en los mismos sitios.

· **pEGFP-GCK:** contiene el cDNA de la isoforma pancreática de la GK humana fusionado a la proteína verde fluorescente (*Green Protein Fluorescent*, GFP) en el vector pEGFP-C3 (Clontech). El cDNA se extrajo del plásmido pGEX5X.2-GCK con la enzima EcoRI. El correspondiente fragmento de aproximadamente 1.8 Kb se insertó en el mismo sitio del vector pEGFP-C3.

· **pEGFP-GCK^(p.299-359) silvestre y mutantes:** contiene el fragmento de cDNA del gen *gck* de rata correspondiente a los aminoácidos 299-359 que incluyen la Señal de Exportación Nuclear (*Nuclear Export Signal*, NES, aminoácidos 300 a 310) fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) en el vector pEGFP-N2 (Clontech) [115]. Este

plásmido, junto con pEGFP-GCK^(p.299-359)mt3 fueron amablemente cedidos por el Dr. M. Magnuson (*Department of Molecular Physiology and Biophysics, University School of Medicine, Nashville, Tennessee*). pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Lys308Arg) y los mutantes pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Val302Glu), pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Arg303Trp), pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Arg308Trp) y pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Asn313Lys) fueron construidos mediante PCR con el kit *Quick Change* utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 4).

La integridad de las secuencias de los plásmidos pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Val302Glu), pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Lys308Arg), pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Arg308Trp) y pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Asn313Lys), fue comprobada primero por análisis de restricción a través de la digestión con la enzima correspondiente y posteriormente por secuenciación directa. La secuencia de pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Arg303Trp) se comprobó directamente mediante secuenciación.

- **pGBKT7-GCKR:** contiene el cDNA de la proteína reguladora de la GK (GKRP) de rata fusionada al dominio de unión a DNA de Gal4 de *S. cerevisiae*. El cDNA de la GKRP se extrajo de pGEX5.2-GCKR [123] utilizando las enzimas BamHI y XhoI y se clonó en pGBKT7 (Clontech) en los sitios BamHI y SalI.

- **pcDNA3-PFKFB1:** contiene el cDNA de la isoforma hepática de rata de la enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (*PFKFB1*) clonado en el vector pcDNA3 (Invitrogen). Este plásmido fue amablemente cedido por el Dr. R. Bartrons (Departamento de Ciencias Fisiológicas II, Universidad de Barcelona).

MUTACIÓN EN GCK	OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA MUTAGÉNESIS		ENZIMA DE RESTRICCIÓN
p.Ile19Asn	GKIle19AsnF GKIle19AsnR	5'-GTAGAGCAGAA A CCTGGCAGAGTTCCA A CTGCAGGAG-3' 5'-CTCCTGCAGTIGGA A CTCTGCCAGG T TCTGCTCTAC-3'	PvuII
p.Ile130Thr	GKIle130ThrF GKIle130ThrR	5'-CTACATCTCTGAGTGC A CTCCGACTTCTGGAC-3' 5'-GTCCAGGAAGTCGGAG G TGCACTCAGAGATGTAG-3'	ApaI
p.Asp205His	GKAsp205HisF GKAsp205HisR	5'-GATGTGGTGGCCATGGTGAAT C ACACGGTGGCCACG-3' 5'-CGTGGCCACCGTGT G ATTCA C CATGGCCACCACATC-3'	NcoI
p.Gly223Ser	GKGly223SerF GKGly223SerR	5'-GAGGTC A GCATGATCGTGGGCACGGGCTGCA A TGCATGCTAC-3' 5'-GTAGCAT T GCAATGCAGCCCGTGCCACGATCATGCT G ACCTC-3'	NsiI
p.Val302Glu	GKVal302GluF GKVal302GluR	5'-GTACATGGGCGAGCT C GAGCGGCTTGCTG-3' 5'-CAGCACAAGCC G CT C GAGCTCGCCCATGTAC-3'	XhoI
p.Arg308Trp	GKArg308TrpF GKArg308TrpR	5'- C GAGCT C GTGCGGCTTGCTGCT T GGCTCGTGG-3' 5'-CCACGAGCC A GAGCAGCACAAGCCGAC G AGCT C G-3'	SacI
p.Asn313Lys	GKAsn313LysF GKAsn313LysR	5'-CTCGTGACGAAA A AGCT T CTCTCCACGGGGAG-3' 5'-CTCCCCGTGGAAGAGA A AG C TTTCTGCTCCACGAG-3'	HindIII
p.His416Arg	GKHis416ArgF GKHis416ArgR	5'-CTCCGTGTACAAGCTGC G CCC A AGCTTCAAGGAG-3' 5'-CTCCTTGA A AGCTTGGG C GCAGCTTGTACAGGAG-3'	HindIII
p.Ala449Thr	GKAla449ThrF GKAla449ThrR	5'-GAGGAGGGCAG C GGCCGGGGC A CGGCCCTGCTG-3' 5'-GACCAGGGCCG T GCCC C GGCCGCTGCCCTCCTC-3'	XmaIII
p.Ala456Val	GKAla456ValF GKAla456ValR	5'-GTCTCGGCGGTGG T CTGTAAGAA A GCCTGTATGCTG-3' 5'-CAGCATAC A GGCTTCTTACAG A CCACCGCCGAGAC-3'	StuI ⁽¹⁾

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis de pGEX5X.2-GCK. En rojo se representan las bases alteradas para dar lugar a la sustitución de aminoácido y en negrita las bases modificadas para introducir dianas de restricción sin afectar a la lectura proteica. El conjunto de bases subrayadas indican la diana de restricción específica para cada caso. El superíndice ⁽¹⁾ indica eliminación del sitio de restricción.

MUTACIÓN EN gck ^(p.299-359)	OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA MUTAGÉNESIS		ENZIMA DE RESTRICCIÓN
p.Val302Glu	rGKVal302GluF rGKVal302GluR	5'-GAAGTATATGGGCGAGCTCGAGCGACTTGCTGCTTAAG-3' 5'-CTTAAGCAGCACAAGTCGCTCGAGCTCGCCCATATACTTC-3'	XhoI
p.Arg303Trp	rGKArg303TrpF3 rGKArg303TrpR3	5'-GGCGAGCTGGTATGGCTTGTCGGCTTAAGCTGGTG-3' 5'-CACCAGCTTAAGCAGCACAAGCCATACCAGCTCGCC-3'	-
p.Lys308Arg	rGKArg308F rGKArg308R	5'-CGAGCTGGTACGACTAGTGCTGCTTAGGCTGGTGG-3' 5'-CCACCAGCCTAAGCAGCACTAGTCGTACCAGCTCG-3'	SpeI
p.Arg308Trp	rGKTrp308F rGKTrp308R	5'-CGAGCTCGTACGACTTGCTGCTTTGGCTGGTGG-3' 5'-CCACCAGCCAAGCAGCACAAGTCGTACGAGCTCG-3'	SacI
p.Asn313Lys	rGKArg313LysF rGKArg313LysR	5'-CTGGTGGACGAGAAAGCTTCTGTCCACGGAG-3' 5'-CTCCGTGGAACAGAAAGCTTCTGTCCACCAG-3'	HindIII

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis para la obtención de los plásmidos pEGFP-GCK^(p.299-359) silvestre y mutantes. Los oligonucleótidos utilizados incluyen, además de la mutación de sustitución de residuo (marcada en rojo) una mutación adicional que añade un nuevo sitio de restricción sin afectar a la lectura de aminoácidos (marcada en negrita). En los plásmidos pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Lys308Arg) y pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Asn313Lys) la mutación de sustitución de residuo origina por sí misma un nuevo sitio de restricción para la enzima SpeI y HindIII, respectivamente.

· **pGBKT7-DUSP12:** contiene el cDNA de la fosfatasa dual DUSP12 humana fusionado al dominio de unión a DNA de Gal4 de *S. cerevisiae*. El cDNA de DUSP12 fue clonado mediante RT-PCR a partir del RNA total de células HepG2, utilizando el sistema de RT-PCR (*Titan One Tube*; Roche Diagnostics) y los oligonucleótidos descritos en la Tabla 5. El fragmento amplificado de 1.1 kb se subclonó en el vector pGEMT-easy (Promega) de donde se extrajo con la enzima BamHI para introducirlo en el mismo sitio del vector pGBKT7.

· **pGBKT7-BAD:** contiene el cDNA humano del promotor de apoptosis, miembro de la familia Bcl-2 que codifica para la proteína BAD, fusionado al dominio de unión a DNA de Gal4 de *S. cerevisiae*. El cDNA de BAD se amplificó por RT-PCR a partir de RNA total de células HepG2, utilizando el sistema de RT-PCR *Titan One Tube PCR System* (Roche Diagnostics) y los oligonucleótidos descritos en la Tabla 5. El fragmento amplificado de 640 pares de bases se subclonó en el vector pGEMT-easy de donde se extrajo con la enzima BamHI para introducirlo en el mismo sitio del vector pGBKT7.

· **pCMV-HA-BAD:** contiene el cDNA de BAD fusionado al epítipo de la hemaglutinina (HA) en el extremo N-terminal, en el vector pCMV-HA (Clontech). El cDNA de BAD se extrajo del plásmido pGBKT7-BAD mediante digestión con la enzima BamHI y se clonó en el sitio BglII del vector pCMV-HA.

· **pCMV-HA-BAD(p.Ser155Asp):** contiene la mutación p.Ser155Asp en el cDNA de BAD fusionado al epítipo HA en el vector pCMV-HA. Fue introducida en el plásmido pCMV-HA-BAD por mutagénesis dirigida mediante PCR con el kit *Quick Change* y utilizando los oligonucleótidos específicos descritos en la Tabla 6. Este plásmido fue seleccionado por análisis de restricción con SacI y posterior secuenciación.

· **pYFP-CRM-1:** contiene el cDNA de la exportina-1 humana (*CRM-1*) fusionado a la proteína amarilla fluorescente (*Yellow Fluorescent Protein*, YFP) en el vector pEGFP-C1 (Clontech) y fue amablemente cedido por la Dra. Carmen Rivas del Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Madrid).

· **pGBKT7-CRM-1:** contiene el cDNA de la exportina-1 humana fusionado al dominio de unión a DNA de Gal4 de *S. cerevisiae*. El cDNA de *CRM-1* se extrajo del plásmido pYFP-CRM-1 mediante digestión con las enzimas BglII y BamHI. El fragmento de aproximadamente 4.3 Kb se clonó en el sitio BamHI del vector pGBKT7 al cual previamente se le había tratado con NdeI y con el fragmento Klenow (Roche Diagnostics) de la DNA polimerasa para cambiar el marco de lectura y hacerlo compatible al de *CRM-1*.

· **pCMV-HA-CRM-1:** contiene el cDNA de *CRM-1* fusionado al epítipo HA en el extremo N-terminal y clonado en el vector pCMV-HA (Clontech). Para extraer este cDNA se digirió el plásmido pYFP-CRM-1 con BamHI. A continuación se trató con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa para obtener extremos romos y posteriormente se digirió con la enzima XhoI para extraer el cDNA de *CRM-1*. Por otra parte, el vector pCMV-HA se trató con la enzima NotI y con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa para obtener extremos romos y posteriormente se digirió con XhoI. El correspondiente fragmento de aproximadamente 4.3 Kb se clonó en el mismo sitio del vector pCMV-HA.

CONSTRUCCIÓN	OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACIÓN POR PCR	
pGBKT7-DUSP12	DUSP12F DUSP12R	5'-GGGATCCCCATGTTGGTGGCTC-3' 5'-GGGATCCTCATATTTTCTGTTTG-3'
pGBKT7-BAD	BADF BADR	5'-GGGATCCGCATGTTCCAGATCCCAG-3' 5'-CCCTCAAAGGAGACAGCAC-3'

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR de los cDNAs de BAD y DUSP12.

MUTACIÓN EN BAD	OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA MUTAGÉNESIS		ENZIMA DE RESTRICCIÓN
p.Ser155Asp	BADSer155AspF	5'-CTATGGCCGCGAAACTCCGGAGGATG GAT GTACGAGTTTG-3'	SacI
	BADSer155AspR	5'-CAAAC TC GTCA TC CATCCTCCG GAGT TCGCGCCATAG-3'	

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis de pCMV-HA-BAD. En rojo se representan las bases alteradas para dar lugar a la mutación BAD(p.Ser155Asp) y en negrita las bases modificadas para introducir dianas de restricción sin afectar a la lectura correcta de la proteína. El conjunto de bases subrayadas indica la diana de restricción eliminada en este caso.

1.2. MICROORGANISMOS

1.2.1. BACTERIAS COMPETENTES Y MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN

Todas las cepas de *Escherichia coli* fueron cultivadas en medio LB en ausencia o presencia de los antibióticos adecuados a 37°C en agitación orbital. Los vectores pGEX5X.2, pACT2, pcDNA3 y pCMV-HA portaban el gen que confería resistencia al antibiótico ampicilina. Se utilizó carbenicilina sal disódica (Sigma) como análogo de ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. Los vectores pGBKT7, pYFP y pEGFP portaban el gen de resistencia a kanamicina. Dicho antibiótico se utilizó a una concentración de 30 µg/ml.

· **DH5-α** [*F*– Φ 80*lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)* U169 *recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+)* *phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1*]. Esta cepa de *E. coli* se utilizó de forma rutinaria en los distintos subclonajes realizados en este trabajo. La preparación de células competentes se llevó a cabo según el protocolo descrito en [225]. Las bacterias competentes se transformaron según el protocolo estándar descrito en [226].

· **BL-21** [*F*– *ompT hsdSB(rB–, mB–)* *gal dcm araB:T7RNAP-tetA*]. Esta cepa de *E. coli* se utilizó en la producción de proteínas de fusión a GST. Para la preparación de bacterias competentes y su transformación se siguió el protocolo descrito en [226].

· **JM109** [*endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rK–, mK+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacI^qΔM15]*, (Promega). Las bacterias competentes de esta cepa de *E. coli* fueron adquiridas comercialmente y se transformaron siguiendo las instrucciones del fabricante para los subclonajes que requirieron una alta eficiencia de transformación.

1.2.2. LEVADURA UTILIZADA EN EL ENSAYO DEL DOBLE HÍBRIDO, MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN Y VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada fue cultivada en medio mínimo sintético dextrosa (SD) en ausencia de los suplementos apropiados para mantener la selección de los plásmidos. El protocolo de transformación de levadura utilizado se

describe en [227]. Para determinar la actividad β -galactosidasa, se crecieron los transformantes seleccionados a 30° hasta una densidad óptica de entre 0.8 y 1.2 a 600 nm. La actividad fue medida en células permeabilizadas en ensayos en filtro tal y como se describe en [227] y expresada en unidades Miller [228].

· **Y187** [MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *gal4 Δ* , *met⁻*, *gal80 Δ* , *URA3: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-LacZ*] (Clontech). Esta cepa de *S. cerevisiae* se utilizó de forma rutinaria en los ensayos de doble híbrido.

1.3. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las líneas celulares empleadas en este trabajo fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂.

· **Cos7** (ATCC CRL-1651): línea celular derivada de fibroblastos de riñón de mono. Se cultivó en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco, Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco, Lonza), glutamina 2 mM (Gibco, Lonza) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Lonza).

· **HEK293T** (ATCC CRL-11268): línea celular procedente de células humanas embrionarias de riñón. Se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de FBS inactivado a 50° durante 30 minutos, glutamina 2 mM y 1% de penicilina/estreptomicina. Los experimentos con este tipo celular se realizaron a pase inferior a 20.

· **HepG2** (ATCC HB-8065): línea celular derivada de carcinoma hepático humano. Se cultivó en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco, Lonza) suplementado con 10% de FBS, glutamina 2 mM y 1% de penicilina/estreptomicina.

2. TÉCNICAS

2.1. TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las preparaciones de DNA plasmídico, los análisis de restricción, las ampliificaciones de DNA por PCR, la subclonación de cDNA y demás técnicas básicas de biología molecular se realizaron siguiendo los protocolos descritos en [226].

Las preparaciones a escala media de DNA plasmídico se realizaron mediante el kit *Plasmid midi* (Qiagen). La subclonación de cDNA en los distintos plásmidos se realizó tras el aislamiento de los fragmentos de restricción a partir de geles de agarosa (Conda-Pronadisa) y posterior purificación mediante el kit *Gel Extraction* (Genycell Biotech). La concentración de DNA se midió en un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN A LA GLUTATION-S-TRANSFERASA (GST)

2.2.1. EXPRESIÓN

La expresión de las proteínas de fusión a GST se realizó en la cepa de *E. coli* BL21. Las bacterias fueron transformadas con el plásmido pGEX5X.2-GCK o sus derivados mutados. Una colonia de cada transformación fue utilizada para inocular tubos con 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de carbenicilina, que fueron incubados durante 8 horas a 37°C en agitador orbital. Se utilizaron 4 ml de los preinóculos para inocular matraces con 200 ml de medio, que se incubaron de la misma manera durante 90 minutos hasta que el cultivo alcanzó una $DO_{600} = 0.5$. En ese momento se añadió isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 0.2 mM para la inducción de la síntesis proteica y la incubación se mantuvo otras 16 horas con agitación a 22-25°C.

2.2.2. PURIFICACIÓN

Las proteínas de fusión GST-GK se purificaron por afinidad usando glutation acoplado a bolitas de agarosa (Sigma-Aldrich) como se describe en [229]. El proceso de purificación, a partir de 200 ml de cultivo, consistió en la sedimentación de las bacterias a 5000 rpm durante 10 minutos seguida de su resuspensión en 30 ml de PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.47 mM, Na_2HPO_4 10 mM, pH 7.4) con ditioneitol (DTT) 5 mM, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 5 mM y cóctel de inhibidores de proteasas (*complete* 1x,

Roche Diagnostics). Tras añadir a la mezcla Tritón X-100 a una concentración final del 1%, las células fueron lisadas utilizando una *French Press* (Termo IEC) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se incubó con 0.7 ml de bolitas de glutation-agarosa, diluidas al 50% en PBS, durante 1 hora a 4°C en rotación. Tras la incubación, las bolitas se lavaron tres veces con 25 ml de PBS con DTT 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 5 mM y *complete* 1x, a temperatura ambiente. Las proteínas de fusión fueron eluidas con tampón de elución (Tris/HCl 50 mM (pH 8.0), DTT 5 mM, KCl 200 mM y glutation reducido 10 mM). Las bolas fueron incubadas durante dos periodos sucesivos de 20 minutos en rotación a temperatura ambiente utilizando 0.25 ml de tampón en cada caso. Al volumen final del eluido se le añadió glicerina a una concentración final del 30% y glucosa a una concentración final de 50 mM. Las proteínas de fusión purificadas fueron almacenadas a -80°C.

La concentración de proteínas se determinó, previamente a la adición de glicerina, mediante el kit "*Bio-Rad Protein Assay*", siguiendo instrucciones del fabricante y utilizando albúmina bovina sérica (BSA, 1mg/ml) como estándar.

2.2.3. DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN A GST EN GELES DE ACRILAMIDA

La detección de proteínas de fusión se llevó a cabo mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles discontinuos de poliacrilamida (SDS-PAGE). Estos geles constaban de una zona superior de compactación (acrilamida:bisacrilamida 29:1 al 5%, Tris/HCl 0.12 M (pH 6.8) y SDS al 0.1%) y una zona inferior de resolución (acrilamida:bisacrilamida 29:1 al 10%, Tris/HCl 0.4 M (pH 8.8) y SDS al 0.1%). A las muestras se les añadió el volumen correspondiente del tampón de carga 2x (Tris/HCl 125 mM (pH 6.8), glicerina al 20%, SDS al 4%, azul de bromofenol al 0.05% y β -mercaptoetanol al 4%) y se desnaturalizaron a 100°C durante 3 minutos. La electroforesis se realizó a 120-150 V en tampón de electroforesis (Tris/HCl 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0.01%). Se utilizaron marcadores de peso molecular (Sigma-Aldrich, Amhersham Bioscences, Fermentas). Tras la tinción de los geles con azul de

Coomasie (Bio-Rad), según se indica en [226], se detectó una banda de aproximadamente 75 kDa para las proteínas GST-GK.

2.3. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA

La actividad glucoquinasa se valoró según el método descrito en [230] y modificado en [229]. La mezcla de reacción, para un volumen de 0.5 ml, contenía Tris/HCl 100 mM (pH 7.4), KCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, β-mercaptoetanol 1.4 mM, BSA al 0.1%, ATP-MgCl₂ 5 mM, NADP⁺ 1 mM, 1U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Roche Diagnostics) y aproximadamente 1 µg de la preparación de enzima purificada. La reacción se inició con la adición de glucosa y se siguió la producción de NADPH por aumento de la absorbancia a 340 nm a 30°C en un espectrofotómetro UVIKONxl (Secomam) durante 5 minutos. La estequiometría de la glucosa fosforilada y la reducción del NADP⁺ es equimolar. Una Unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de sustrato por minuto en las condiciones descritas.

Para determinar las variables cinéticas con respecto a la glucosa, se utilizaron 14 concentraciones diferentes de sustrato: 0.1; 0.25; 0.5; 1; 2; 3; 5; 7.5; 10; 20; 30; 50; 75 y 100 mM. Para determinar la afinidad de la enzima por glucosa ($S_{0.5}$) y el coeficiente de Hill (h) se aplicó la ecuación de Hill:

$$\log \left[\frac{v}{V_{\text{máx}} - v} \right] = h \cdot \log[S] - h \cdot \log S_{0.5}$$

Para valorar la actividad respecto al ATP, se eliminó el ATP-MgCl₂ de la mezcla de reacción y se añadió glucosa a una concentración equivalente al valor de la correspondiente $S_{0.5}$ indicada en la sección de resultados. La reacción se inició con la adición de 9 concentraciones de ATP-MgCl₂ (0.02; 0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 0.75; 1; 3 y 5 mM). Los parámetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ con respecto a la glucosa y K_m para el ATP se calcularon mediante la representación de Hanes-Wolf:

$$\frac{[S]}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \right) + \frac{[S]}{V_{m\acute{a}x}}$$

La constante catalítica (K_{cat}) se calculó como $V_{m\acute{a}x}$ /mol de enzima, usando glucosa como sustrato y sus valores fueron extrapolados a 37°C como se indicó anteriormente en [206, 231].

El índice de actividad (I_a) se calculó a partir de los parámetros cinéticos K_{cat} , $S_{0.5}$, h , K_m y la concentración intracelular de ATP (2.5 mM) aplicando la expresión matemática [206]:

$$I_a = \frac{[ATP]}{[ATP] + K_m} \cdot \frac{K_{cat}}{S_{0.5}^h} \left(s^{-1} \cdot \frac{1}{mmol^h} \right)$$

El I_a de cada proteína mutante se refirió al calculado para la proteína silvestre GST-GK, obteniendo el I_a relativo (I_{ar}) expresado sin unidades.

$$I_{ar} = \frac{I_a(GST - GK_{mutante})}{I_a(GST - GK_{silvestre})}$$

2.3.1. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA EN PRESENCIA DE INHIBIDORES COMPETITIVOS

La actividad glucoquinasa fue valorada en presencia de sus inhibidores competitivos (N-acetil-D-glucosamina (NAG), D-manoheptulosa (MH), GKRP y palmitoil-CoA), según se detalla a continuación.

2.3.1.1. N-acetil-D-glucosamina y D-manoheptulosa

La sensibilidad de las GK silvestre y mutantes a la inhibición de su actividad enzimática por los inhibidores competitivos N-acetil-D-glucosamina (Sigma-Aldrich) y D-manoheptulosa (Sigma-Aldrich) se valoró mediante el procedimiento habitual descrito en el apartado 2.3.

2.3.1.2. GGRP y palmitoil-CoA

La valoración de la actividad enzimática GK inhibida por GGRP y por palmitoil-CoA se determinó según se describe en [216]. La GGRP humana purificada fue amablemente proporcionada por *KJ Brocklehurst (Cardiovascular and Gastrointestinal Department, AstraZeneca, Macclesfield, Cheshire, United Kingdom)*. El palmitoil-CoA (Sigma-Aldrich) fue preparado en PBS a una concentración de 155 μ M. La mezcla final de reacción contenía Hepes 25 mM (pH 7.1), KCl 25 mM, ATP-MgCl₂ 1 mM, NADP 1 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, MgCl₂ 2.5 mM, 1U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Roche Diagnostics) y proteína GST-GK silvestre o mutantes a una concentración de 61 nM.

Los ensayos de inhibición de la actividad GK silvestre y mutantes se llevaron a cabo en presencia de 10 μ M de sorbitol-6-fosfato (S6P, Sigma-Aldrich) o 0.2 mM fructosa-1-fosfato (F1P, Sigma-Aldrich) y cuatro concentraciones de GGRP (10; 50; 100; y 200 nM), en un volumen final de reacción de 0.05 ml. La sensibilidad de la actividad GK silvestre y mutantes al palmitoil-CoA se valoró a 5 concentraciones del inhibidor (1; 2; 5; 10; 15 μ M) en un volumen final de reacción de 0.5 ml. En ambos casos, la reacción se inició con la adición de glucosa 5 mM y se valoró la actividad enzimática durante 5 minutos.

2.3.1.3. Determinación de K_i

Los valores de K_i (constante de inhibición) para los inhibidores competitivos N-acetil-D-glucosamina, D-manoheptulosa y palmitoil-CoA fueron calculados mediante la representación de Dixon [232] usando 3 concentraciones de glucosa [2; 5 y 8 mM para GST-GK; 12.5; 25; y 50 mM para el mutante GST-GK(p.Gly223Ser) y 1; 1.5 y 2 mM para el mutante GST-GK(p.Ala449Thr)] y 5 concentraciones de inhibidor (0.05; 0.1; 0.25; 0.5 y 1 mM para NAG; 0.5; 1; 2; 5 y 10 mM para MH y 1; 2; 5; 10; 15 μ M para palmitoil-CoA).

2.3.2. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA EN PRESENCIA DE LY2121260 O DE ISONIACIDA

El activador sintético de la glucoquinasa (2-(S)-cyclohexyl-1-R-(4-methanesulfonyl-phenyl)-cyclopropanecarboxylic acid thiazol-2-ylamide (LY2121260, Eli Lilly and Company) y la hidrazida isonicotínica (Isoniacida, Sigma-Aldrich) fueron almacenados a -80°C a una concentración de 1 mM en DMSO 80% y Hepes 12.5 mM (pH 7.4). La mezcla de reacción, para un volumen de 0.5 ml, contenía Tris/HCl 100 mM (pH 7.4), KCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, β-mercaptoetanol 1.4 mM, BSA al 0.1%, ATP-MgCl₂ 5 mM, NADP⁺ 1 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1U/ml y proteína purificada GST-GK 61 nM. El ensayo se realizó a una concentración final de 10 μM de LY2121260 o de isoniácida, siempre en presencia de DMSO 0.8%.

2.3.2.1. Determinación de EC₅₀

Los valores de EC₅₀ para el activador LY2121260 fueron calculados mediante el programa *GraphPad Prism*® 5.04. El ensayo se llevó a cabo a 8 concentraciones de activador (0.005; 0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 5 y 10 μM) para las proteínas GST-GK, GST-GK(p.Met235Val) y GST-GK(p.Asn313Lys). La reacción se inició con la adición de glucosa 5 mM y se valoró la actividad enzimática durante 5 minutos de reacción.

2.4. ENSAYO DE TERMOESTABILIDAD

Los ensayos de termoestabilidad de cada GK mutante frente a la GK silvestre se realizaron utilizando una concentración fija de proteína de 0.25 mg/mL. El experimento se realizó diluyendo las soluciones de enzima en stock hasta 250 ng/μL en el tampón de congelación que contenía glicerol al 30%, glucosa 50 mM, DTT 5 mM, KCl 200 mM, Tris/HCl 50 mM (pH 8.0) y glutatión reducido 10 mM. Las diluciones de proteínas fueron incubadas a diferentes temperaturas (30, 37, 42, 50, 52 y 55°C) durante 30 min, para posteriormente medir su actividad enzimática a concentraciones saturantes de glucosa (100 mM).

Por otra parte, se llevaron a cabo experimentos a la temperatura crítica de 50°C monitorizando la inactivación de la GK a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos). La actividad enzimática, medida a concentraciones saturantes de glucosa (100 mM), se calculó en porcentajes relativos a la actividad a tiempo 0, antes de la incubación.

2.5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA *IN VITRO*

2.5.1. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS *IN VITRO*

Se obtuvieron proteínas *in vitro*, mediante un sistema de transcripción/traducción utilizando lisados de reticulocitos de conejo (*TNT Coupled reticulocyte lysate system*, Promega) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo con 1 µg de los plásmidos correspondientes y en presencia de 20 µCi de [³⁵S]metionina (1000 Ci/mmol) (Amersham Biosciences) durante 90 minutos a la temperatura de 30°C.

Las cantidades relativas de proteínas sintetizadas *in vitro* fueron determinadas por electroforesis en SDS-PAGE al 10%. Una vez realizada la electroforesis, los geles se secaron sobre papel *whatman* en un secageles *Slab gel drier GD2000* (Amersham) a 80°C durante 15 minutos y fueron expuestos a películas autorradiográficas de alta sensibilidad (Sigma-Aldrich) a -80°C durante 16 horas.

2.5.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST-GK PARA ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA (*PULL DOWN*) *IN VITRO*

Se procedió del mismo modo que en los apartados 2.2.1 y 2.2.2, con las particularidades que se indican a continuación:

Un cultivo bacteriano de 25 ml se centrifugó para sedimentar las bacterias y posteriormente se resuspendió en 7 ml de tampón de lisis (Tris/HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), NaCl 150 mM, DTT 5 mM y *complete* 1x). Tras añadir a la mezcla

Tritón X-100 hasta una concentración final del 1%, las células fueron lisadas por presión en una *French press* FA-078AE (Thermo Scientific). A continuación, 1 ml del sobrenadante del lisado, previamente centrifugado durante 10 minutos a 10000 g, fue incubado durante una hora a 4°C en rotación con 150 µl de bolas de glutathion-agarosa al 50% en PBS. Tras lavar las bolas cinco veces con 1 ml de tampón de lavado (tampón de lisis con Tritón X-100 al 1%), fueron recogidas por centrifugación a 6000 g durante 30 segundos. La cantidad relativa de proteína pegada a las bolitas de glutathion-agarosa fue determinada mediante SDS-PAGE al 10% y tinción con azul de Coomassie. Se obtuvieron bandas únicas tanto para la proteína GST como para las proteínas de fusión GST-GK de 25 y 75 kDa, respectivamente.

2.5.3. ENSAYOS DE *PULL DOWN IN VITRO*

Los ensayos de *pull-down in vitro* para detectar interacciones entre proteínas se realizaron según se describe en [197].

Cantidades iguales de proteínas GST, GST-GK silvestre y mutantes unidas a bolitas de glutathion-agarosa fueron lavadas tres veces con su correspondiente tampón de ensayo a 6000 g durante 30 segundos. Tras 3 lavados consecutivos, las proteínas de fusión a GST acomplexadas con bolitas de glutathion-agarosa, se incubaron con la proteína correspondiente previamente sintetizada *in vitro* y marcada con [³⁵S]metionina durante una hora a 4°C en rotación en presencia de 0.5 ml de su tampón de ensayo. En los ensayos con GKRP, PF2K-Pasa y DUSP12, la cantidad utilizada de proteína marcada radiactivamente fue del 20%, 40% y 50% de la proteína total sintetizada *in vitro*, respectivamente. Los ensayos de *pull down* para las proteínas BAD y exportina-1 se realizaron con un 25% de la proteína total marcada. Tras centrifugar 1 minuto a 1000 g, se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento 5 veces sucesivas con 1 ml del tampón de incubación. La cantidad de proteína GST y proteínas de fusión GST-GK fue determinada por SDS-PAGE al 10% teñidos con azul de Coomassie. Una vez realizada la electroforesis, los geles secos fueron expuestos a películas autorradiográficas de alta sensibilidad (Sigma-Aldrich) a -80°C durante 16 horas.

Los tampones utilizados en los ensayos de interacción *in vitro* entre las distintas proteínas se indican a continuación:

- **GK-DUSP12:** Tris/HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), NaCl 150 mM, DTT 1 mM, glucosa 25 mM, Tritón X-100 al 0.1% y *complete* 1x.
- **GK-GKRP:** HEPES 25 mM (pH 7.1), MgCl₂ 1 mM, KCl 25 mM, DTT 1 mM, Tritón X-100 al 1% y *complete* 1x. En unos casos este tampón se completaba con 0.5 mM de fructosa-6-fosfato (F6P, Sigma-Aldrich) y glucosa 5 mM y en otros con 0.5 mM de F1P y glucosa 25 mM.
- **GK-PF2K-Pasa:** HEPES 25 mM (pH 7.4), MgCl₂ 1 mM, KCl 25 mM, glucosa 25 mM, DTT 1 mM, Tritón X-100 al 0.1% y *complete* 1x.
- **GK-BAD:** Tris/HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), DTT 1 mM, glucosa 25 mM, Tritón X-100 al 0.1%, utilizando 5 concentraciones de NaCl (50; 75; 100; 150 y 250 mM).
- **GK-exportina-1:** En estos ensayos se utilizaron dos condiciones distintas, las utilizadas para la interacción de GK-DUSP12 y de GK-PF2K-Pasa.

2.6. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFEROS EN CULTIVO

Los experimentos de transfección transitoria de las líneas celulares Cos-7 y HEK293T se llevaron a cabo con lipofectamina® (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron sembradas a una concentración de 50000 células/ml y transfectadas a una confluencia del 70-80% en el caso de las Cos-7 y del 50-60% en las HEK293T con las cantidades de los plásmidos correspondientes indicadas en Resultados. En los experimentos realizados en células HEK293T, las placas fueron previamente tratadas con 1µg/ml de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas durante 6 horas con

la mezcla de transfección y posteriormente, durante 42 horas, con medio completo hasta su análisis o recogida.

Tras el proceso de transfección, en los casos así indicados en Resultados, las células se fijaron durante 20 minutos a 4°C con 1 ml de paraformaldehído al 4%. A continuación, se realizaron tres lavados con 1 ml de PBS. Para teñir los núcleos, las células fueron tratadas durante 10 minutos con una solución de 1 µg/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich). Tras lavar el exceso de DAPI con PBS, los cubreobjetos con las células tratadas se montaron y se sellaron con una gota de *Fluoromount G* (Electron Microscopy Sciences) sobre un portaobjetos.

2.7. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

Para la obtención de extractos celulares, las células Cos-7 y HEK293T fueron cultivadas en placas de 60 mm y transfectadas con 6 µg de DNA y 25 µg de lipofectamina. 42 horas después de la transfección, las células fueron lavadas con 1 ml de PBS y recogidas en 0.25 ml del tampón correspondiente. Las células Cos-7 transfectadas, fueron recogidas en Hepes 10 mM (pH 7.4), KCl 142.5 mM, NP40 al 0.2% y *complete* 1x. Las células HEK293T fueron recogidas en Tris/HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM, Tritón X-100 al 0.1%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, glicerol al 10% y *complete* 1x. Las células fueron lisadas en hielo mediante 10 pases a través de una jeringa de insulina. Este lisado se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm a 4°C, recogiendo el sobrenadante para el proceso de inmunoprecipitación de proteínas.

2.8. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Los extractos celulares de las líneas Cos-7/HEK293T transfectadas con los plásmidos correspondientes fueron obtenidos según se indica en el apartado 2.7. Se reservó una alícuota de 10 µl como control de transfección. El resto del lisado se llevó a un volumen final de 0.5 ml del tampón correspondiente. El lisado se incubó duran-

te 1 hora a 4°C en agitación con 10 µl de anticuerpo monoclonal anti-HA covalentemente inmovilizado con una matriz de proteína-A-sefarosa (Roche Diagnostics). Tras centrifugar 1 minuto a 1000 g, se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento durante 10 minutos con 0.5 ml del tampón de incubación correspondiente tres veces sucesivas. A continuación se resuspendió en 10 µl de tampón de carga 2x, se desnaturizó a 100°C durante 3 minutos, se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad y seguidamente, se cargaron 2 µl de sobrenadante en un gel de SDS-PAGE al 10% para detectar la proteína inmunoprecipitada y el resto en otro gel de las mismas características que el anterior para detectar la coimmunoprecipitada. Tras la electroforesis, se realizó una inmunodetección para detectar ambas proteínas mediante *western blot*.

Los tampones utilizados en los ensayos de interacción *in vitro* entre las distintas proteínas se indican a continuación:

- **GFP-GK y BAD:** Tris/HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM, Tritón X-100 al 0.1%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y *complete* 1x.

- **GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y exportina-1:** Tris/HCl 20 mM (pH 7.6), NaCl 150 mM, ácido etilenglicol-bis(b-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA) 1 mM, EDTA 1 mM, NP40 al 0.5% y *complete* 1x.

2.9. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

Las proteínas BAD, exportina-1 y GFP se detectaron en extractos de células Cos- 7 y HEK293T transfectadas, mediante la técnica del *western blot*. Los extractos celulares se desnaturizaron durante 3 minutos a 100°C en presencia de β-mercaptoetanol al 4%, se sometieron a SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de Immobilon (Millipore) mediante el sistema *Trans-Blot Semi-Dry* (Bio-Rad). El tampón de transferencia contenía Tris/HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.02% y metanol al 20%. La transferencia se realizó durante 20 minutos a 15V. En los casos así indicados, la membrana se tiñó con *Fast-Green* (Bio-Rad) durante 5 minutos

para detectar la proteína inmunoprecipitada y tras varios lavados con H₂O, se des-tiñó durante 30 minutos con *TBS-Tween* (NaCl 140 mM, Tris/HCl 20 mM y Tween 20 al 20%) para evitar que el colorante interfiriera en los pasos posteriores. Tras la transferencia y/o tinción de las proteínas, la membrana se bloqueó durante 16 horas a 4°C con agitación en solución de bloqueo (*TBS-Tween*, 5% de leche desnatada). Para la detección de las proteínas BAD y exportina-1 la membrana se incubó con el anticuerpo primario *rat anti-HA monoclonal* (clone 3F10, Roche Diagnostics) a una dilución 1:1000 en solución de bloqueo durante 1 hora y agitación rotacional a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo se retiró con tres lavados en *TBS-Tween* de 10 minutos cada uno, tras lo cual se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario *goat anti-rat-HRP* (Cultek) diluido 1:4000 en solución de bloqueo. Para la detección de la proteína GFP, tras el bloqueo, se realizó una incubación de una hora con el anticuerpo primario *rabbit anti-GFP N-terminal* (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:4000 en solución de bloqueo y a temperatura ambiente. Tras la incubación, se realizaron tres lavados sucesivos de 10 minutos cada uno en *TBS-Tween* y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario *goat antirabbit IgG-HRP* (Upstate Biotechnology) a una dilución 1:5000 en solución de bloqueo. Tras la incubación con los anticuerpos secundarios, la membrana se sometió a tres lavados con *TBS-Tween* en agitación y a temperatura ambiente. La detección se llevo a cabo utilizando un sistema de quimioluminiscencia ECL (Millipore) según instrucciones del fabricante y por exposición a películas autorradiográficas (Konica Minolta).

2.10. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES MEDIANTE MICROSCOPIA

Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Leica DMIRE2 con sistema confocal TCS SP2 y se analizaron con el programa LCS Lite de Leica en el Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El análisis y la comparación de secuencias de DNA se llevaron a cabo con los programas *DNASTar Lasergene* [233] y *ClustalW2* [234]. El análisis de los modelos estructurales de la GK se realizó con los programas *Rasmol V2.7.5.2* (Roger Sayle, *Biomolecular Structures Group, Glaxo Wellcome Research & Development* [235]) y *Pymol Molecular Graphics System* (Schrödinger). La denominación de las mutaciones en el gen GCK se llevó a cabo utilizando el sistema clásico de nomenclatura de aminoácidos de tres letras.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Excel (Microsoft Office 2003). La significación estadística se obtuvo mediante el test *t de Student's* con dos colas y tres grados de libertad. Valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Para investigar el efecto que ejercen las distintas mutaciones sobre la actividad de la glucoquinasa, se ha llevado a cabo un estudio funcional de las correspondientes proteínas mutadas. Para ello, se han introducido los cambios correspondientes en el cDNA de la isoforma de célula β pancreática humana de la glucoquinasa, fusionada a la glutathion-S-transferasa. Sobre estas proteínas de fusión y teniendo en cuenta la localización estructural de los residuos afectados y su conservación entre otras glucoquinasas y hexoquinasas de distintos orígenes, se han determinado los parámetros cinéticos, la estabilidad proteica, la interacción con la GKRP y otras proteínas que se asocian a la glucoquinasa, el efecto sobre la sensibilidad a moléculas que activan o inhiben a la enzima y sobre su localización subcelular.

Las mutaciones estudiadas se han agrupado en función de la localización de los correspondientes residuos mutados en la estructura proteica de la glucoquinasa. Así, se ha analizado el efecto de las mutaciones que afectan a residuos localizados en el centro activo de la enzima o muy próximos a él y a residuos localizados en la periferia de su estructura proteica.

1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUTACIONES OBJETO DE ESTUDIO

Las mutaciones analizadas en este trabajo se describen en la Tabla 7. Todas ellas, excepto la mutación p.Asn313Lys, se habían identificado en pacientes con características clínicas de MODY2. Estos pacientes presentaban una leve hiperglucemia en ayunas (6-8 mM), un incremento inferior a 3.5 mM en los valores de glucemia dos horas después de una sobrecarga oral de glucosa y unos valores de hemoglobina glicosilada (HBA1c) inferiores al 7%. Estos datos clínicos concuerdan con los descritos en pacientes MODY2 [236]. Además, ninguno de los pacientes requería tratamiento farmacológico ni había desarrollado complicaciones diabéticas crónicas.

Por otro lado, la mutación p.Asn313Lys se había identificado en una paciente de 41 años, sin antecedentes familiares de alteraciones en la homeostasis de glucosa, con episodios de hipoglucemia tras el inicio de un tratamiento antituberculoso con 600 mg/día de isoniácida. Durante el tratamiento con este antibiótico, la paciente

presentó unos valores de glucemia de 2.5/2.8 mM en el ayuno y de 1.8 mM en el posprandio y tras discontinuar el tratamiento, estos valores se incrementaron hasta alcanzar 3.9/4.4 mM.

MUTACIÓN (Cambio de aminoácido)	MUTACIÓN (Cambio de nucleótido)	EXON	FENOTIPO CLÍNICO	NÚMERO DE FAMILIAS	DIAGNÓSTICO GENÉTICO
p.Ile19Asn	c.56T>A	GCK1	MODY 2	2	[237]; J. Oriola, R. Casamitjana (Hospital Clinic, Barcelona).
p.Ile130Thr	c.389T>C	GCK4	MODY 2	3	[8, 238]; O. Rubio-Cabezas, A. Campos-Barros, J. Argente (Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid).
p.Phe150Tyr	c.449T>A	GCK4	MODY 2	2	[8, 239]; L. Sacchetti (<i>Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche de la Università Federico II y CEINGE Biotecnologie Avanzate</i> , Nápoles).
p.Val154Leu	c.460G>T	GCK4	MODY 2	1	L. Sacchetti
p.Asp205His	c.613G>C	GCK6	MODY 2	1	O. Rubio-Cabezas, A. Campos-Barros, J. Argente.
p.Gly223Ser	c.667G>A	GCK6	MODY 2	16	[237, 238, 240, 241]; O. Rubio-Cabezas, A. Campos-Barros, J. Argente
p.Val302Glu	c.905T>A	GCK8	MODY 2	1	J. Oriola, R. Casamitjana.
p.Arg303Trp	c.909C>T	GCK8	MODY 2	5	[2, 7, 8]; L. Sacchetti.
p.Arg308Trp	c.922A>T	GCK8	MODY 2	3	[8, 197, 237]
p.Asn313Lys	c.939C>G	GCK8	Episodios de hipoglucemia	1	J. Oriola, R. Casamitjana. M. Puig (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona).
p.His416Arg	c.1247A>G	GCK9	MODY 2	1	O. Rubio-Cabezas, A. Campos-Barros, J. Argente.
p.Ala449Thr	c.1345G>A	GCK10	MODY 2	3	[8]; O. Rubio-Cabezas, A. Campos-Barros, J. Argente. M.A. Navas (Este laboratorio).

Tabla 7. Descripción de las mutaciones p.Ile19Asn, p.Ile130Thr, p.Phe150Tyr, p.Val154Leu, p.Asp205His, p.Gly223Ser, p.Val302Glu, p.Arg303Trp, p.Arg308Trp, p.Asn313Lys, p.His416Arg y p.Ala449Thr. Se muestran los cambios de aminoácido y nucleótido producidos por la mutación correspondiente, el exón donde se localiza el residuo mutado, el número de familias donde fueron identificadas y su fenotipo clínico y la referencia de su diagnóstico genético. La numeración de los nucleótidos es relativa al primer nucleótido (A) del primer codón ATG designado como +1 y basada en la secuencia NM_000162.

2. LOCALIZACIÓN DE LOS RESIDUOS AFECTADOS EN EL MODELO ESTRUCTURAL Y CONSERVACIÓN EN OTRAS GLUCOQUINASAS Y HEXOQUINASAS

Los residuos mutados se han localizado en la estructura proteica de la GK basándonos en su modelo cristalizado en conformación cerrada (PDB código 1V4S) y se han representado usando el programa de visualización de estructura *Rasmol* [235] (Figura 18).

Los residuos Phe¹⁵⁰, Val¹⁵⁴, Asp²⁰⁵, Gly²²³ e His⁴¹⁶ se localizan en posiciones centrales de la proteína. Los residuos Phe¹⁵⁰, Val¹⁵⁴ se ubican en las láminas β -5 y β -6, respectivamente, en una región constituida fundamentalmente por láminas β , situada debajo del centro catalítico y que forma parte del dominio menor de la enzima (Figuras 18A y 19). El residuo Asp²⁰⁵ se localiza en la hélice α -5, que estructuralmente forma parte del centro activo de la enzima, en la región que conecta los dominios menor y mayor de la GK. Los residuos Gly²²³ e His⁴¹⁶ se sitúan en el dominio mayor: el primero en la lámina β -9 y el segundo en la hélice α -11', entre la lámina β -12 y la hélice α -12 (Figuras 18A y 19).

Como se muestra en la Figura 19 los residuos Asp²⁰⁵, Phe¹⁵⁰ y Gly²²³ se encuentran muy conservados entre distintas especies de glucoquinasas y hexoquinasas. El residuo His⁴¹⁶ se encuentra muy conservado entre glucoquinasas y hexoquinasas de distintas especies, salvo en levadura. Sin embargo, el residuo Val¹⁵⁴ se encuentra conservado solamente entre glucoquinasas de distintas especies, pero no en otras hexoquinasas.

Por otro lado, los residuos Ile¹⁹, Ile¹³⁰, Val³⁰², Arg³⁰³, Arg³⁰⁸, Asn³¹³ y Ala⁴⁴⁹ se sitúan en posiciones más periféricas de la proteína (Figura 18B). El residuo Ile¹⁹ se localiza en la hélice α -1 en el dominio mayor de la enzima y se conserva interespecíficamente entre glucoquinasas, pero no en hexoquinasas. El residuo Ile¹³⁰ se sitúa en la hélice α -3, flanqueada por regiones constituidas fundamentalmente por láminas β , formando parte del núcleo hidrofóbico del dominio menor de la GK. Este residuo se encuentra conservado en glucoquinasas

humana, de ratón y rata, mientras que en *Xenopus laevis* y hexoquinasas de distintas especies aparece un residuo de naturaleza polar en esta posición. El residuo Asn³¹³ se encuentra localizado en el lazo que conecta las hélices α -8 y α -9 en el dominio mayor. Por otro lado, los residuos Val³⁰², Arg³⁰³ y Arg³⁰⁸ se localizan dentro de la señal de exportación nuclear de la GK, en la hélice α -8, en el dominio mayor de la enzima. El carácter hidrofóbico del residuo Val³⁰² se encuentra muy conservado interespecíficamente en glucoquinasas y hexoquinasas. El carácter básico del residuo Arg³⁰⁸, al igual que el residuo Asn³¹³, se mantiene en las glucoquinasas de distintas especies, pero no en hexoquinasas (Figura 19). El residuo Arg³⁰³ se encuentra muy conservado interespecíficamente entre glucoquinasas y hexoquinasas. Por otro lado, el residuo Ala⁴⁴⁹ se localiza en la hélice α -13, en el dominio menor de la enzima, muy próximo al sitio alostérico [20] y se encuentra muy conservado entre glucoquinasas y hexoquinasas (Figura 19).

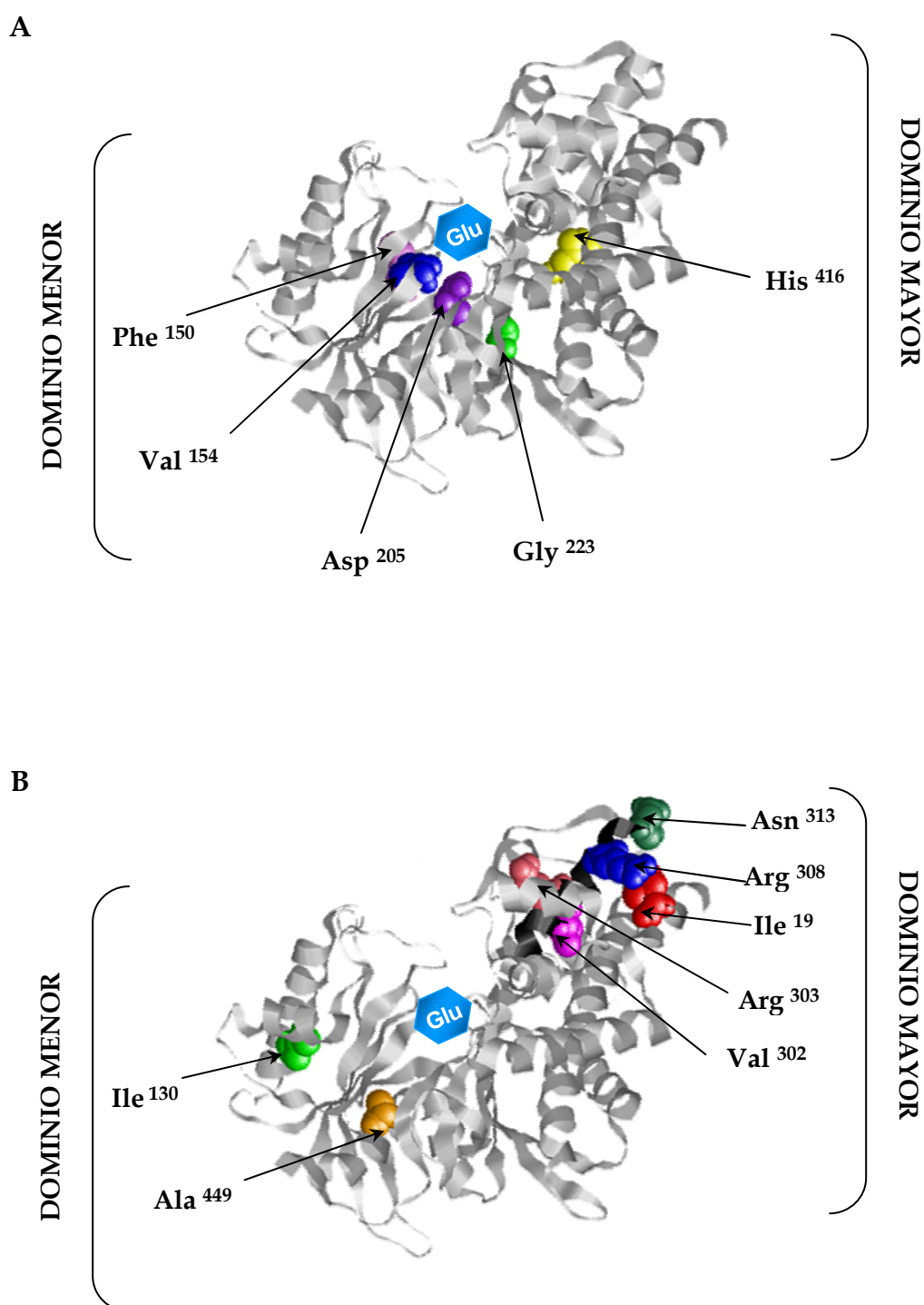


Figura 18. Localización de los residuos Phe¹⁵⁰, Val¹⁵⁴, Asp²⁰⁵, Gly²²³, His⁴¹⁶, Ile¹⁹, Ile¹³⁰, Val³⁰², Arg³⁰³, Arg³⁰⁸, Asn³¹³ y Ala⁴⁴⁹ en el modelo estructural de la GK en conformación cerrada. La estructura proteica (PDB, código IV4S) se ha representado utilizando el programa *Rasmol* V2.7.5.2 (Roger Sayle, Biomolecular Structures Group, Glaxo Wellcome Research & Development [235]). Se muestran los dominios mayor y menor de la enzima. Los residuos mutados se muestran en colores bajo la forma de bolas. La posición de la glucosa se indica por un hexágono de color azul. **A.** Localización de los residuos mutados situados en el centro activo o muy próximos a él. **B.** Localización de los residuos mutados situados en posiciones periféricas de la proteína.

GK human	-----MLDDRARMEAAKKEKVEQ	Ile ¹⁹	LAEFQLQ	26		
GK mur	-----MLDDRARMEATKKEKVEQ	Ile ¹⁹	LAEFQLQ	26		
GK rat	-----MAMDTTRCGAQLLTLVEQ	Ile ¹⁹	LAEFQLQ	26		
GK Xenopus	-----METFDQNEVDQ	Ile ¹⁹	LSEFHLQ	19		
HK-1 rat	PQYSRRFHKTLLRLVPDSVDRFLLSES	GTGKGAAMVTAVAYRLAQHRQIEET	LAHFRLS	480		
HK-2 rat	PHFAKRLHKAVRRLVPDCVRFLLRSED	SGSGKGAAMVTAVAYRLADQHRARQKT	LESCLKS	480		
HK-A yeast	-----MVHLGPKKPQARKGSMADVP	KELMDEIHQL	EDMFTVD	37		
HK-B yeast	-----MVHLGPKKPQARKGSMADVP	KELMQQIENFEKIFTVP		37		
GK human	87 MLVKVGEAGEGQWSVTKKHQMSIPEDAMTGTAEMLFDYISEC	Ile ¹³⁰	ISDFLDKHQMK--HKK	143		
GK mur	87 MLVKVGEAGEAGQWSVTKKHQMSIPEDAMTGTAEMLFDYISEC	Ile ¹³⁰	ISDFLDKHQMK--HKK	143		
GK rat	87 MLVKVGEAGEAGQWSVTKKHQMSIPEDAMTGTAEMLFDYISEC	Ile ¹³⁰	ISDFLDKHQMK--HKK	143		
GK Xenopus	80 MLVKVGEDLEGQWKVETKHKMYSIPVDAMTG-TAEMLFDYIAEC	Ile ¹³⁰	ISDYLDQQNMK--HKK	136		
HK-1 rat	541 LLVKIRSGK--KRTVEMHNKIYSIPLEIMQG-TGDELFDHIVSC	Ile ¹³⁰	ISDFLDYMGIK--GPR	595		
HK-2 rat	541 LLVVRVRNGK--RRGVMEMHNKIYSIPQEVMHG-TGEELFDHIVQC	Ile ¹³⁰	CIADFLEYMGMK--GVS	595		
HK-A yeast	95 VLVKLSGNH---TFDITTSQSKYKLPDMRTTKHQEELWSFIADS	Ile ¹³⁰	LKDFMVEQEELNLTKDT	150		
HK-B yeast	95 VLVKLGGR---TFDITTSQSKYRLPDAMRRTQNPDELWEFIADS	Ile ¹³⁰	SLKAFIDEQFPQGIS	150		
GK human	144 LPLGFTSFPVRHEDIDKGILLNWTGFKASGAEGNNVGLLRDAIKRRGDFEMDVAMV	Phe ¹⁵⁰ Val ¹⁵⁴		203		
GK mur	144 LPLGFTSFPVRHEDIDKGILLNWTGFKASGAEGNNVGLLRDAIKRRGDFEMDVAMV	Phe ¹⁵⁰ Val ¹⁵⁴		203		
GK rat	144 LPLGFTSFPVRHEDIDKGILLNWTGFKASGAEGNNVGLLRDAIKRRGDFEMDVAMV	Phe ¹⁵⁰ Val ¹⁵⁴		203		
GK Xenopus	137 LPLGFTSFPVRHEDIDKGILLNWTGFKASGAEGNNVGLLRDAIKRRGDFEMDVAMV	Phe ¹⁵⁰ Val ¹⁵⁴		196		
HK-1 rat	596 MPLGFTSFPCHQTNLDCGILISWTKGPKATDCEGHDVASLLRDAVKKREBFDLDVAVV	Phe ¹⁵⁰ Val ¹⁵⁴		655		
HK-2 rat	596 LPLGFTSFPCCQNSLDQSILLKWTGFKASGCEGEDVVTLLKEAHRREBFDLDVAVV	Phe ¹⁵⁰ Val ¹⁵⁴		655		
HK-A yeast	151 LPLGFTSYPPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNVEGHVVP	Phe ¹⁵⁰ Val ¹⁵⁴	LLQNEISKR-ELPIEIVALI	209		
HK-B yeast	151 LPLGFTSYPPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNIEHNDVV	Phe ¹⁵⁰ Val ¹⁵⁴	PMLQKQITKR-NPIEIVALLI	209		
GK human	204 NDTVATMISCYEDHQCEVGMIVGTGCNACMEEMQNVELVEG	Asp ²⁰⁵	-----DEGRMCVNTE	256		
GK mur	204 NDTVATMISCYEDRQCEVGMIVGTGCNACMEEMQNVELVEG	Gly ²²³	-----DEGRMCVNTE	256		
GK rat	204 NDTVATMISCYEDRQCEVGMIVGTGCNACMEEMQNVELVEG	Gly ²²³	-----DEGRMCVNTE	256		
GK Xenopus	197 NDTVATMISCYEDHHCEVGLIVGTGCNACMEEMSNVELVEG	Gly ²²³	-----EGRMCVNTE	249		
HK-1 rat	656 NDTVGTMMTCAYEETCEI	Gly ²²³	GLIVGTGTNACMEEMKNVEMVEG	-----NQGQMCINME	708	
HK-2 rat	656 NDTVGTMMTCGYEDPHCEVGLIVGTGSNACMEEMRNVELVDG	Gly ²²³	-----EGRMCVNME	708		
HK-A yeast	210 NDTVGTLIASYYTDPETKMSVIFGTGVNGAFYDVVSDIEK	Gly ²²³	LEGKLADDIPSNPMAINCE	269		
HK-B yeast	210 NDTTGTLVASYYTDPETKMSVIFGTGVNGAYYDVCSDIEK	Gly ²²³	LQGLSDDIPSPAPMAINCE	269		
GK human	257 WGAFGDSGELDEFLLEYDRLVDESSANPGQQLYEKLI	Val ³⁰² Arg ³⁰³ Arg ³⁰⁸ Asn ³¹³	GGKYMGEIVLVLI	RLVDENLLF	316	
GK mur	257 WGAFGNSGELDEFLLEYDRMVDESSVNPQQLYEKII	Val ³⁰² Arg ³⁰³ Arg ³⁰⁸ Asn ³¹³	GGKYMGEIVLVLI	KLVEENLLF	316	
GK rat	257 WGAFGDSGELDEFLLEYDRMVDESSANPGQQLYEKII	Val ³⁰² Arg ³⁰³ Arg ³⁰⁸ Asn ³¹³	GGKYMGEIVLVLI	KLVDENLLF	316	
GK Xenopus	250 WGAFGDTGELEDRLLEYDRVDEASLNPGQQLYEKMI	Val ³⁰² Arg ³⁰³ Arg ³⁰⁸ Asn ³¹³	GGKYMGEIVLVLI	IKMVNEENLLF	309	
HK-1 rat	709 WGAFGDNGCLDDIRTFDKVVDDEYSLNSGKQRF	Val ³⁰² Arg ³⁰³ Arg ³⁰⁸ Asn ³¹³	EKMISGMYLGEIVN	ILIDFTTKRGLF	768	
HK-2 rat	709 WGAFGDNGCLDDLRTVFDVAVDELSLNPQKQRF	Val ³⁰² Arg ³⁰³ Arg ³⁰⁸ Asn ³¹³	EKMISGMYLGEIVN	ILIDFTTKRGLF	768	
HK-A yeast	270 YGSFDN-EHLVLPRTKYDVAVDQSPRPQQA	Val ³⁰² Arg ³⁰³ Arg ³⁰⁸ Asn ³¹³	FEKMTSGYYLGELL	LVLI	ELNEKCLML	328
HK-B yeast	270 YGSFDN-EHVVLPRTKYDITIDEESPRPGQQT	Val ³⁰² Arg ³⁰³ Arg ³⁰⁸ Asn ³¹³	FEKMTSGYYLGELL	LALMD	MYKGFIF	328
GK human	375 STRAAHMCSAGLAGVINRMRESRSEDVMRITVGVDGS	His ⁴¹⁶	VYKLHPSFKERFHASVRRLT---	431		
GK mur	375 STRAAHMCSAGLAGVINRMRESRSEDVMRITVGVDGS	His ⁴¹⁶	VYKLHPSFKERFHASVRRLT---	431		
GK rat	375 STRAAHMCSAGLAGVINRMRESRSEDVMRITVGVDGS	His ⁴¹⁶	VYKLHPSFKERFHASVRRLT---	431		
GK Xenopus	368 STRAAIMCSAGLAGILNMRQSRREELLRITVGVDGS	His ⁴¹⁶	VYKLHPSFKDKFHATVCLKT---	424		
HK-1 rat	827 SKRAAQLCGAGMAAVVEKIRENRGLDHLNVTVGVDG	His ⁴¹⁶	TLYKLHPHFSRIMHQTVKELS---	883		
HK-2 rat	827 ARRAAQLCGAGMAAVVDKIRENRGLDHLNVTVGVDG	His ⁴¹⁶	TLYKLHPHFAVMHETVRDLA---	883		
HK-A yeast	389 GTRAAARLAVCGIAAICQKRGYKTG-----HIAADG	His ⁴¹⁶	SVYNYKYPGFKEAAAKGLRDIYGT	442		
HK-B yeast	389 GARAARLSVCGIAAICQKRGYKTG-----HIAADG	His ⁴¹⁶	SVYNYKYPGFKEKAANALKDIYGT	442		
GK human	432 ----PNCETIFIESEEGSGRG	Ala ⁴¹⁶	ALVSAVACKKACMLGQ-----	465		
GK mur	432 ----PNCETIFIESEEGSGRG	Ala ⁴¹⁶	ALVSAVACKKACMLGQ-----	465		
GK rat	432 ----PNCETIFIESEEGSGRG	Ala ⁴¹⁶	ALVSAVACKKACMLAQ-----	465		
GK Xenopus	425 ----SGCEITFIQSEEGSGRG	Ala ⁴¹⁶	ALISAVAYKMAVMIGH-----	458		
HK-1 rat	884 ----PKCTVSFLLSEDSGSGK	Ala ⁴¹⁶	ALITAVGVRLRGDPSTIA-----	918		
HK-2 rat	884 ----PKCDVSFLESDSGSGK	Ala ⁴¹⁶	ALITAVACRIEAGQR-----	917		
HK-A yeast	443 GDASKD-PITIVPAEDGSGAG	Ala ⁴¹⁶	AVIAALSEKRIAEGKSLGIIGA	485		
HK-B yeast	443 QTSLLDDYPIKIVPAEDGSGAG	Ala ⁴¹⁶	AVIAAALQKRIAEGKSVGIIGA	486		

Figura 19. Alineamiento de la secuencia polipeptídica de la GK pancreática humana a otras glucoquinasas y hexoquinasas para analizar la conservación de los residuos Ile¹⁹, Ile¹³⁰, Phe¹⁵⁰, Val¹⁵⁴, Asp²⁰⁵, Gly²²³, Val³⁰², Arg³⁰³, Arg³⁰⁸, Asn³¹³, His⁴¹⁶ y Ala⁴¹⁶ mediante el programa *ClustalW2* [234]. Los números indican los aminoácidos en las secuencias polipeptídicas de las proteínas. Los marcos indican el correspondiente residuo mutado. Se indica la estructura secundaria de la proteína en hélices α y láminas β y en color la conservación de los residuos.

3. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST-GK SILVESTRE Y MUTANTES

Las proteínas de fusión GST-GK se han obtenido utilizando una estrategia de purificación de proteínas en un único paso, comúnmente utilizada por los laboratorios interesados en el estudio de mutaciones que afectan a la GK, de fácil manipulación y elevada reproducibilidad (*como revisión ver [8]*).

Mediante mutagénesis dirigida del plásmido pGEX5X.2-GCK se obtuvieron plásmidos con las correspondientes mutaciones en los cuales el cDNA de la GK estaba fusionado a la GST. Estos plásmidos se introdujeron en la cepa de *E.coli* BL-21 para su expresión y las proteínas de fusión se purificaron por afinidad tal y como se describe en el apartado 2.2.2 de la sección de Materiales y Métodos.

Se realizaron al menos dos purificaciones de la proteína de fusión GST-GK silvestre y de cada uno de los mutantes GST-GK(p.Phe150Tyr), GST-GK(p.Val154Leu), GST-GK(p.Asp205His), GST-GK(p.Gly223Ser), GST-GK(p.His416Arg), GST-GK(p.Ile19Asn), GST-GK(p.Ile130Thr), GST-GK(p.Val302Glu), GST-GK(p.Arg303Trp), GST-GK(p.Arg308Trp), GST-GK(Asn313Lys) y GST-GK(p.Ala449Thr) para comparar sus efectos sobre los parámetros cinéticos. El rendimiento de las purificaciones se midió en cantidad de proteína obtenida por volumen de cultivo de partida, obteniéndose valores dentro de un rango entre 1.58 y 14.3 mg/l (Tablas 8, 9 y 10), obteniéndose del mutante GST-GK(p.Arg303Trp) el valor más bajo.

La pureza de cada extracto de proteína se analizó mediante geles de SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomasie. Como se muestra en la Figura 20, en todos los casos se detectó una banda única de aproximadamente 75 kDa.

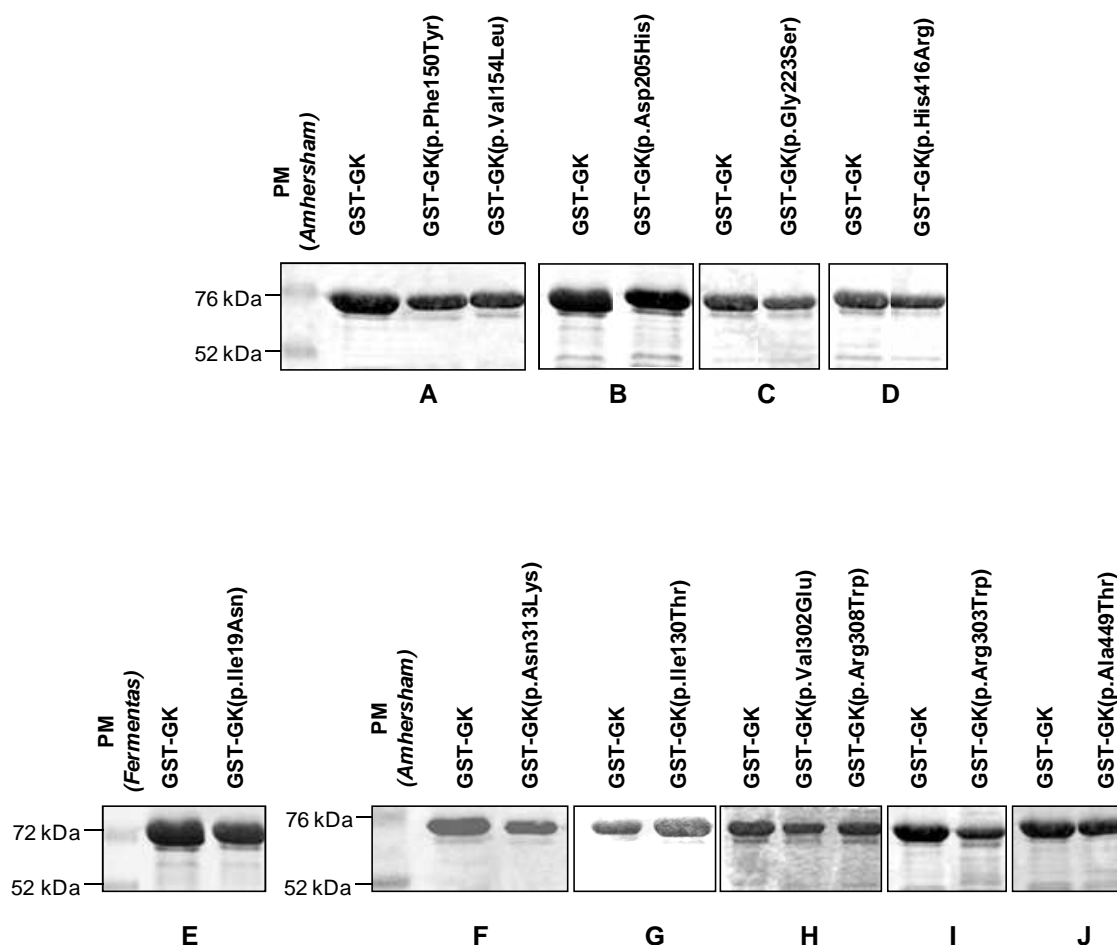


Figura 20. Proteínas de fusión GST-GK silvestre y mutantes purificadas. Tras la purificación, 2 μ l de cada proteína se sometieron a SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10% y posterior tinción con azul de Coomassie. Se muestra un gel representativo para cada proteína purificada. A-J corresponden a geles independientes. Se observan las bandas correspondientes a las proteínas de fusión GST-GK silvestre y mutantes con un peso molecular de aproximadamente 75 kDa. PM: marcador de peso molecular de la casa comercial indicada.

4. ANÁLISIS CINÉTICO DE LAS GLUCOQUINASAS RECOMBINANTES PURIFICADAS

Se analizó el efecto de las mutaciones sobre los parámetros cinéticos de la actividad glucoquinasa mediante un método espectrofotométrico, en un ensayo acoplado a NADP y G6PDH como se describe en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos.

Para analizar la actividad GK dependiente de glucosa de las proteínas purificadas, se valoró la actividad enzimática en un rango de concentración de este sustrato entre 0.1 y 100 mM. Los resultados, representados en las Figuras 21A y 22A muestran una cinética de saturación ligeramente sigmoidea para la proteína de fusión GST-GK, que refleja la cooperatividad de la enzima para este sustrato. De forma análoga, la actividad glucoquinasa dependiente de ATP se valoró en un rango de concentración de este sustrato entre 0.02 y 5 mM. En este caso, como se muestra en las Figuras 21B y 22B, la cinética de saturación para la proteína de referencia GST-GK muestra un comportamiento *michaeliano*. Debido a esta diferencia de comportamiento cinético dependiente del sustrato, los parámetros cinéticos mostrados en las Tablas 8, 9 y 10 se calcularon mediante las ecuaciones matemáticas adecuadas, especificadas en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos.

Para analizar el efecto de las mutaciones sobre la actividad global de la enzima, se calculó el índice de actividad (I_a) mediante una expresión matemática que engloba todos los parámetros cinéticos como se indica en Materiales y Métodos. El I_{ar} , calculado para cada uno de los mutantes, se refirió al de la proteína de referencia GST-GK, al que se dio el valor de 1.

4.1. ANÁLISIS CINÉTICO DE MUTACIONES LOCALIZADAS PRÓXIMAS AL CENTRO ACTIVO

Según se muestra en la Figura 21 y en la Tabla 8, todas las mutaciones analizadas en este apartado ejercen un fuerte efecto sobre la actividad GK como cabría esperar debido a su localización próxima al centro activo de la enzima. La mutación p.Asp205His ejerce el efecto más drástico sobre la actividad de la enzima, inactivándola en su totalidad, no pudiéndose obtener valores medibles de actividad para dicha proteína mutante. El resto de mutaciones también ejercen un efecto grave sobre la actividad glucoquinasa, manifestándose en una reducción de hasta el 99.5% en el índice de actividad de las enzimas mutantes respecto a la proteína de referencia GST-GK (Tabla 8). La constante catalítica de las proteínas GST-GK(p.Phe150Tyr) y GST-GK(p.His416Arg) disminuye en un 80% y 98%, respectivamente, respecto a la proteína de referencia (Tabla 8). Las dos mutaciones afectan fuertemente a la afinidad de la enzima por glucosa, disminuyéndola del orden de 13 y 9 veces, respectivamente y dando lugar a una pérdida total de cooperatividad para este sustrato. Además, ambas mutaciones afectan a la afinidad de la enzima por su segundo sustrato, el ATP, hasta 7 veces respecto a la proteína de referencia GST-GK. La mutación p.Val154Leu afecta a la afinidad de la enzima por sus sustratos, disminuyéndola alrededor de 3 veces respecto a la proteína de referencia, sin ejercer efecto estadísticamente significativo sobre la constante catalítica ni sobre la cooperatividad por glucosa, aunque sí sobre el punto de inflexión. Finalmente, la mutación p.Gly223Ser presenta una disminución de hasta el 94% en el índice de actividad respecto a GST-GK. Este efecto es debido principalmente a una reducción del 75% en el valor de su constante catalítica y en la afinidad de la enzima por sus sustratos glucosa y ATP, del orden de 6 y 3 veces, respectivamente.

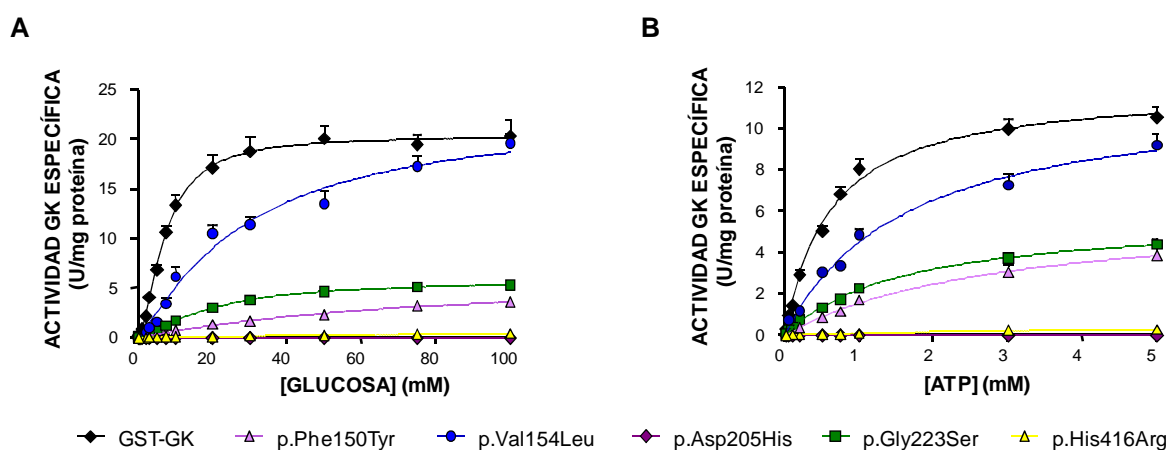


Figura 21. Curvas de actividad glucoquinasa dependiente de sustratos de la GST-GK silvestre y de las proteínas mutantes GST-GK(p.Phe150Tyr), GST-GK(p.Val154Leu), GST-GK(p.Asp205His), GST-GK(p.Gly223Ser) y GST-GK(p.His416Arg). **A.** Actividad dependiente de glucosa. **B.** Actividad dependiente de ATP. Los valores representados en la curva corresponden a la media y EEM de al menos dos valoraciones realizadas por duplicado con proteínas procedentes de al menos dos purificaciones independientes.

Proteína	Rendimiento proteico (mg/l)	K _{cat} (s ⁻¹)	S _{0.5} para glucosa (mM)	h	K _m para ATP (mM)	I _{ar}
GST-GK (n=12)	9.23 ± 1.68	50.27 ± 2.16	7.84 ± 0.08	1.46 ± 0.02	0.52 ± 0.02	1.00 ± 0.08
GST-GK(p.Phe150Tyr) (n=9)	3.07 ± 0.55	9.92 ± 2.38 **	101.4 ± 6.2 **	1.06 ± 0.05 **	3.11 ± 0.48 **	0.015 ± 0.002 **
GST-GK(p.Val154Leu) (n=9)	2.77 ± 0.48	46.6 ± 4.4	26.0 ± 3.4 **	1.54 ± 0.01 *	1.62 ± 0.16 **	0.10 ± 0.02 **
GST-GK(p.Asp205His) (n=2)	7.7/3.3	NO ACTIVIDAD GK DETECTABLE				
GST-GK(p.Gly223Ser) (n=5)	8.8/6.7	12.90 ± 0.52 **	44.0 ± 3.81 *	1.12 ± 0.01 **	1.6 ± 0.1 *	0.057 ± 0.009 **
GST-GK(p.His416Arg) (n=4)	6.5/6.6	1.02 ± 0.08 **	67.9 ± 2.27 *	1.00 ± 0.02 **	3.74 ± 0.10 **	0.003 ± 0.0004 **

Tabla 8. Parámetros cinéticos de las proteínas recombinantes GST-GK y mutantes GST-GK(p.Phe150Tyr), GST-GK(p.Val154Leu), GST-GK(p.Asp205His), GST-GK(p.Gly223Ser) y GST-GK(p.His416Arg), localizados dentro o próximos al centro activo. Los datos se expresan según la media ± EEM de n valoraciones procedentes de al menos 2 purificaciones independientes. El índice de actividad relativo (I_{ar}) y el coeficiente de Hill (h) carecen de unidades. (*)p<0.005 y (**)p<0.0001.

4.2. ANÁLISIS CINÉTICO DE MUTACIONES LOCALIZADAS EN RESIDUOS PERIFÉRICOS

La determinación de los parámetros cinéticos para la proteína mutante GST-GK(p.Asn313Lys) muestra que la mutación p.Asn313Lys no afecta a la constante catalítica ni a la afinidad de la enzima por el ATP (Figura 22; Tabla 9). Sin embargo, produce un ligero, pero significativo, incremento en la afinidad y disminución en la cooperatividad por glucosa de la enzima, lo que se traduce en un índice de actividad que casi duplica el de la proteína de referencia GST-GK.

Las mutaciones MODY2 localizadas en residuos periféricos analizadas en este apartado (Figura 22; Tabla 10) producen, en general, una reducción de la actividad GK menor que aquellas localizadas en posiciones cercanas al centro activo, analizadas en el apartado anterior. De este grupo de mutaciones las más afectadas son p.Ile130Thr y p.Val302Glu, que conservan al menos un 15% de la actividad global de referencia. En el caso de los mutantes GST-GK(p.Ile19Asn) y GST-GK(p.Ile130Thr), la reducción en el índice de actividad es debido principalmente a una disminución en la K_{cat} . Aunque estas mutaciones no afectan a la afinidad de la enzima por glucosa, modifican la afinidad de la enzima por ATP, disminuyendo la K_m ligeramente en el caso de la mutación p.Ile19Asn y del orden de 4 veces en la mutación p.Ile130Thr. Además, la mutación que afecta al residuo Ile¹³⁰ induce una pérdida total de cooperatividad por glucosa. De manera similar se observa que el principal defecto causado por las mutaciones p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp es una reducción del valor de la K_{cat} . Pese a su localización alejada del centro activo, las mutaciones p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp, localizadas en la misma hélice α , modifican ligera, pero significativamente, el valor de la $S_{0.5}$ por glucosa. Las mutaciones, p.Val302Glu y p.Arg303Trp también modifican la K_m para ATP. En el caso de la mutación p.Arg303Trp estos cambios suponen un ligero aumento en la afinidad por los sustratos.

La proteína mutante GST-GK(p.Ala449Thr) presenta un índice de actividad global mayor que las mutaciones MODY2 descritas anteriormente, a pesar de que la

mutación p.Ala449Thr afecta fuertemente a todos los parámetros cinéticos de la glucoquinasa. Este mutante presenta una pérdida total de cooperatividad por glucosa, como muestra su índice de Hill cercano a la unidad. La constante catalítica de esta GK mutante se reduce en un 93% y su afinidad por ATP en más de 3 veces respecto a la de la proteína de referencia. Estos efectos se ven, sin embargo, contrarrestados por un incremento en la afinidad de la enzima por glucosa de casi 5 veces, lo cual conlleva que no se observen diferencias significativas en el valor del índice global de actividad de la enzima mutante respecto a la de referencia.

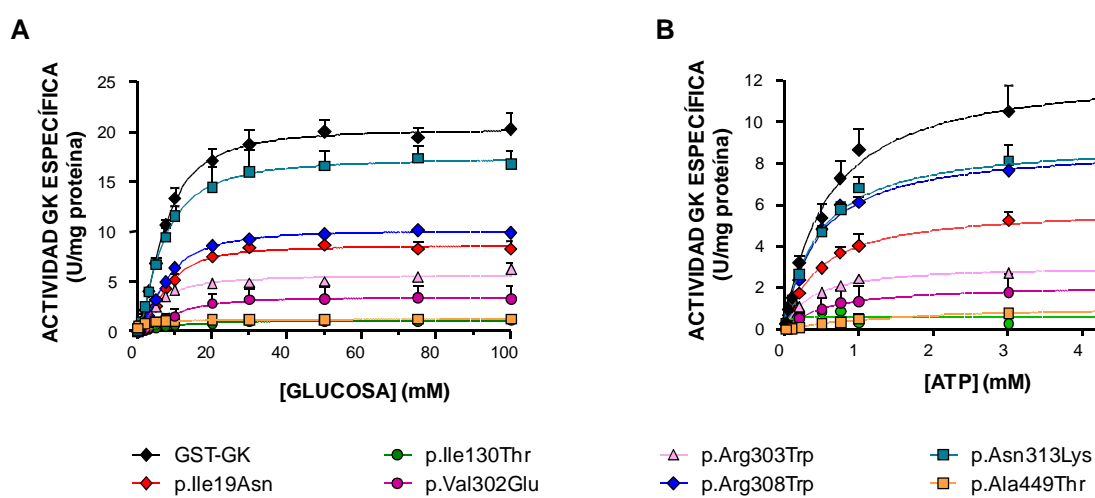


Figura 22. Curvas de actividad glucoquinasa dependiente de sustratos de la GST-GK silvestre y de las proteínas mutantes GST-GK(p.Ile19Asn), GST-GK(p.Ile130Thr), GST-GK(p.Val302Glu), GST-GK(p.Arg303Trp), GST-GK(p.Arg308Trp), GST-GK(p.Asn313Lys), GST-GK(p.Ala449Thr). A. Actividad dependiente de glucosa. B. Actividad dependiente de ATP. En la gráfica se representa la actividad enzimática. Los valores representados en la curva corresponden a la media y EEM de al menos dos valoraciones realizadas por duplicado con proteínas procedentes de al menos dos purificaciones independientes.

Proteína	Rendimiento proteico (mg/l)	K _{cat} (s ⁻¹)	S _{0.5} para glucosa (mM)	h	K _m para ATP (mM)	I _{ar}
GST-GK (n=12)	9.23 ± 1.68	50.27 ± 2.16	7.84 ± 0.08	1.46 ± 0.02	0.52 ± 0.02	1.00 ± 0.08
GST-GK(p.Asn313Lys) (n=8)	1.68 ± 0.07	45.16 ± 3.07	5.46 ± 0.27 **	1.34 ± 0.01 **	0.53 ± 0.03	1.88 ± 0.19 *

Tabla 9. Parámetros cinéticos de las proteínas recombinantes GST-GK y mutante GST-GK(p.Asn313Lys) localizada en una posición periférica de la proteína. Los datos se expresan según la media ± EEM de n valoraciones procedentes de seis y tres purificaciones independientes en el caso de las proteínas GST-GK y GST-GK(p.Asn313Lys), respectivamente. El índice de actividad relativo (I_{ar}) y el coeficiente de Hill (h) carecen de unidades. (*)p<0.005 y (**)p<0.0001.

Proteína	Rendimiento proteico (mg/l)	K _{cat} (s ⁻¹)	S _{0.5} para glucosa (mM)	h	K _m para ATP (mM)	I _{ar}
GST-GK (n=12)	9.23 ± 1.68	50.27 ± 2.16	7.84 ± 0.08	1.46 ± 0.02	0.52 ± 0.02	1.00 ± 0.08
GST-GK(p.Ile19Asn) (n=4)	4.65/3.45	21.33 ± 0.77 ***	9.39 ± 0.84	1.45 ± 0.01	0.39 ± 0.02 **	0.34 ± 0.06 ***
GST-GK(p.Ile130Thr) (n=4)	11.5/17.1	2.88 ± 0.29 ***	8.59 ± 0.45	1.00 ± 0.02 ***	0.13 ± 0.02 **	0.16 ± 0.03 ***
GST-GK(p.Val302Glu) (n=7)	1.75 ± 0.17	7.73 ± 1.76 ***	10.2 ± 0.3 **	1.32 ± 0.04 **	0.65 ± 0.01 ***	0.15 ± 0.03 ***
GST-GK(p.Arg303Trp) (n=9)	1.58 ± 0.26	14.59 ± 1.38 ***	4.62 ± 0.10 ***	1.52 ± 0.02 *	0.29 ± 0.01 ***	0.62 ± 0.06 **
GST-GK(p.Arg308Trp) (n=8)	6.81 ± 0.37	22.3 ± 0.81 ***	10.70 ± 0.36 *	1.36 ± 0.02 *	0.5 ± 0.0	0.35 ± 0.03 ***
GST-GK(p.Ala449Thr) (n=6)	9.65 ± 0.07	3.21 ± 0.28 **	1.33 ± 0.08 **	0.95 ± 0.02 **	1.81 ± 0.08 **	0.98 ± 0.08

Tabla 10. Parámetros cinéticos de las proteínas recombinantes GST-GK y mutantes MODY2 GST-GK(p.Ile19Asn), GST-GK(p.Ile130Thr), GST-GK(p.Val302Glu), GST-GK(p.Arg303Trp), GST-GK(p.Arg308Trp) y GST-GK(p.Ala449Thr), localizadas en posiciones periféricas de la proteína. Los datos se expresan según la media ± EEM de n valoraciones procedentes de al menos dos purificaciones independientes. El índice de actividad relativo (I_{ar}) y el coeficiente de Hill (h) carecen de unidades. (*)p<0.05 y (**)p<0.005 y (***)p<0.0001.

4.2.1. EFECTO DE LOS INHIBIDORES COMPETITIVOS N-ACETILGLUCOSAMINA Y D-MANOHEPTULOSA Y DEL PALMITOIL-CoA Y DEL ACTIVADOR ALOSTÉRICO LY2121260 SOBRE LA ACTIVIDAD DEL MUTANTE MODY2 GST-GK(p.Ala449Thr)

Tal y como se describe en el apartado anterior, la mutación p.Ala449Thr, pese a no afectar de forma global a la actividad GK, ejerce un efecto drástico sobre todos los parámetros cinéticos del enzima, siendo destacable el incremento en la afinidad por glucosa, atípico para una mutación MODY2. Por esta razón se amplió el estudio cinético de esta mutación, analizando su efecto sobre la sensibilidad de la GK a los inhibidores competitivos N-acetil-D-glucosamina (NAG), D-manoheptulosa (MH) y palmitoil-CoA y al activador alostérico LY2121260.

Previamente se ha descrito que para inhibir a la enzima, los análogos de glucosa NAG y MH se unen al sitio catalítico de la GK en su conformación abierta y cerrada, respectivamente, mientras que el palmitoil-CoA lo hace a un putativo centro regulador [242]. Además, se ha observado que mutaciones localizadas en el sitio catalítico afectan a la afinidad por glucosa, NAG y MH, mientras que mutaciones alejadas del sitio catalítico, que afectan a la afinidad por glucosa, afectan también a la afinidad por MH pero no por NAG [43, 211, 242].

Se realizaron estudios de inhibición enzimática por NAG, MH y palmitoil-CoA en el mutante GST-GK(p.Ala449Thr) y se comparó al efecto inhibitorio ejercido sobre la actividad de referencia GST-GK y sobre el mutante GST-GK(p.Gly223Ser), cuya mutación está localizada muy próxima al centro activo.

Para determinar el valor de la K_i , de manera independiente a la afinidad por glucosa de un determinado mutante, se valoró la actividad glucoquinasa a tres concentraciones de sustrato que fueron igual o inferior al valor de su correspondiente $S_{0.5}$. Los valores de K_i mostrados en la Tabla 11 se calcularon a partir del plot de Dixon utilizando las concentraciones de sustrato e inhibidores indicadas, según se describe en el apartado 2.3.1.3 de Materiales y Métodos.

Nuestros resultados revelan que la mutación p.Gly223Ser produce un incremento en la K_i para NAG y MH de 2 y 3 veces, respectivamente y una disminución del 50% para el palmitoil-CoA. Por otro lado, la mutación p.Ala449Thr no afecta a la inhibición producida por NAG, pero sí induce una disminución del valor de K_i para el inhibidor MH del 45%. Además, esta mutación produce una disminución del 27% en la K_i del palmitoil-CoA.

Según se describe en la Introducción, se han identificado pequeñas moléculas sintéticas que ejercen un efecto activador sobre la actividad glucoquinasa por unión al sitio alostérico de la enzima. Debido a que el residuo Ala⁴⁴⁹ se localiza próximo al sitio alostérico de la GK, quisimos estudiar el efecto del activador LY2121260 sobre la actividad de la proteína mutada GST-GK(p.Ala449Thr), comparándolo al ejercido sobre la proteína de referencia GST-GK, al mutante GST-GK(p.Asn313Lys) que presenta un ligero, pero significativo, incremento de la afinidad por glucosa y al mutante MODY2 GST-GK(p.Met235Val) cuya mutación está ubicada en el sitio alostérico de la enzima [20]. En estudios previos, realizados en nuestro laboratorio, habíamos observado que la proteína mutante GST-GK(p.Met235Val) presentaba una disminución de la K_{cat} del 60% respecto a la proteína silvestre GST-GK, mientras que las afinidades por los sustratos glucosa y ATP no se veían significativamente alteradas, lo que conducía a una reducción en la actividad GK del 50% respecto a la proteína de referencia GST-GK [197].

Nuestros resultados, mostrados en la Tabla 12, demuestran que, tal y como se describió previamente [243], la molécula activadora LY2121260 es capaz de incrementar la actividad GK de la proteína de referencia aumentando la velocidad de la reacción y la afinidad de la enzima por glucosa. El activador, a una concentración de 10 μ M, aumenta la constante catalítica hasta un 30% y la afinidad por glucosa del orden de 5 veces, eliminando la cooperatividad de la enzima por dicho sustrato. Un efecto similar se observa sobre el mutante GST-GK(p.Asn313Lys). Sin embargo, el activador LY2121260 no afecta a la K_{cat} del mutante GST-GK(p.Met235Val), aunque es capaz de aumentar la afinidad por glucosa en algo más de 2 veces sin afectar a la cooperatividad por este sustrato. Por otra parte, el activador no afecta a la afinidad

de la proteína mutante GST-GK(p.Ala449Thr) por glucosa, sin embargo, produce un ligero pero significativo incremento en su constante catalítica.

Ya que el activador LY2121260 ejerce un efecto claro sobre la afinidad de la GK por glucosa de las proteínas GST-GK y mutantes GST-GK(p.Met235Val) y GST-GK(p.Asn313Lys), se determinó el valor de la concentración del activador a la cual se obtiene un 50% de activación de la actividad enzimática (EC_{50}). Nuestros resultados, mostrados en la Tabla 12, muestran que la mutación p.Met235Val produce un incremento del valor de la EC_{50} del orden de 3 veces respecto a la proteína GST-GK, mientras que la mutación p.Asn313Lys no produce efectos significativos en este valor respecto a la proteína de referencia GST-GK.

PROTEÍNA	K _i para NAG (mM)	K _i para MH (mM)	K _i para Palmitoil-CoA (μM)
GST-GK	0.21 ± 0.03	1.22 ± 0.14	3.06 ± 0.27
GST-GK(p.Gly223Ser)	0.38 ± 0.04 *	3.57 ± 0.33 **	1.42 ± 0.13 ***
GST-GK(p.Ala449Thr)	0.25 ± 0.02	0.67 ± 0.04 *	2.24 ± 0.14 *

Tabla 11. Valores de K_i para los inhibidores competitivos N-acetilglucosamina (NAG) D-manoheptulosa (MH) y palmitoil-CoA. Se utilizaron tres valores diferentes de concentración de glucosa (2, 5 y 8 mM para GST-GK; 12.5, 25 y 50 mM para GST-GK(p.Gly223Ser) y 1, 1.5 y 2 mM para GST-GK(p.Ala449Thr)) y 5 concentraciones de inhibidor (0.05; 0.1; 0.25; 0.5 y 1 mM para NAG; 0.5; 1; 2; 5 y 10 mM para MH y 1; 2; 5; 10; 15 μM para palmitoil-CoA. Los resultados mostrados representan la media y el EEM de al menos cuatro experimentos realizados con al menos dos purificaciones independientes de cada proteína. (*)p<0.03, (**)p<0.003 y (***)p<0.0003.

PROTEÍNA	S _{0.5} para glucosa (mM)		K _{cat} (s ⁻¹)		h		EC ₅₀ (μM)
	TAMPÓN	LY2121260	TAMPÓN	LY2121260	TAMPÓN	LY2121260	
GST-GK	7.90 ± 0.31	1.67 ± 0.05 **	100.0 ± 5.33	130.81 ± 3.92 **	1.56 ± 0.05	0.92 ± 0.10 ***	1.34 ± 0.09
GST-GK (p.Met235Val)	7.86 ± 0.28	3.34 ± 0.44 ***	67.64 ± 5.60	82.19 ± 4.12	1.87 ± 0.16	1.40 ± 0.12	4.73 ± 0.18 ***
GST-GK (p.Asn313Lys)	5.44 ± 0.28	1.40 ± 0.12 ***	106.93 ± 4.30	130.06 ± 3.67 **	1.81 ± 0.04	1.02 ± 0.05 ***	1.26 ± 0.12
GST-GK (p.Ala449Thr)	2.88 ± 0.33	3.32 ± 0.22	13.92 ± 0.84	19.38 ± 1.50 *	1.33 ± 0.08	1.60 ± 0.16	

Tabla 12. Efecto del activador alostérico LY2121260 sobre los parámetros cinéticos de las proteínas recombinantes GST-GK y mutantes GST-GK(p.Met235Val), GST-GK(p.Asn313Lys) y GST-GK(p.Ala449Thr). Los datos se expresan según la media ± EEM de cuatro valoraciones enzimáticas de proteínas procedentes de dos purificaciones independientes. El coeficiente de Hill (h) carece de unidades. Los valores de K_{cat} se expresan en términos relativos, referidos a la proteína GST-GK valorada en presencia de tampón sin activador. La significación estadística se calculó comparando los valores obtenidos en presencia de activador frente a los obtenidos en el tampón sin activador. Todas las valoraciones se realizaron en presencia de 0.8% DMSO, debido a que el activador se diluye en un tampón que contiene este compuesto. (*)p<0.03 y (**)p<0.006 y (***)p<0.0001.

5. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA ESTABILIDAD PROTEICA DE LA GLUCOQUINASA. ENSAYOS DE TERMOESTABILIDAD

Se llevaron a cabo ensayos de termoestabilidad de la proteína de referencia GST-GK y los mutantes GST-GK(p.Ile19Asn), GST-GK(p.Phe150Tyr), GST-GK(p.Val154Leu), GST-GK(p.Val302Glu), GST-GK(p.Arg303Trp), GST-GK(p.Arg308Trp), GST-GK(Asn313Lys) y GST-GK(p.Ala449Thr) para analizar el posible efecto de las mutaciones sobre la estabilidad proteica de la GK. Para ello, se valoró la actividad GK tras incubar las proteínas de fusión durante 30 minutos en un rango de temperatura establecido entre 30°C y 55°C.

Nuestros resultados, mostrados en la Figura 23A, confirman que tal y como ya se describió previamente, la actividad glucoquinasa de la proteína de referencia GST-GK permanece prácticamente constante hasta una temperatura de 50°C, cayendo bruscamente a temperaturas superiores [207]. Según se muestra en la Figura 23A, este comportamiento es observado también en las proteínas mutantes GST-GK(p.Asn313Lys) y GST-GK(p.Ala449Thr). Sin embargo, la actividad glucoquinasa del resto de mutantes disminuye tras la incubación durante 30 minutos a la temperatura crítica de 50°C. Mientras que GST-GK(p.Ile19Asn), GST-GK(p.Phe150Tyr), GST-GK(p.Val154Leu) y GST-GK(Arg303Trp) registran una bajada en la actividad enzimática de hasta el 70%, los mutantes GST-GK(p.Val302Glu) y GST-GK(p.Arg308Trp) presentan una bajada más brusca de hasta el 89% y 97%, respectivamente.

Para estudiar la cinética de inactivación térmica a 50°C de las glucoquinasas mutantes, incubamos las proteínas a esta temperatura durante diferentes tiempos entre 0 y 60 minutos. La actividad enzimática se valoró a concentraciones saturantes de glucosa y se calculó en porcentajes relativos a la actividad medida a tiempo 0, previo a la incubación (Figura 23B). Los resultados obtenidos indican que, como ya observamos en el ensayo anterior, las proteínas mutantes GST-GK(p.Asn313Lys) y GST-GK(p.Ala449Thr) no presentan inactivación de su actividad a la temperatura de 50°C. Por otro lado, la proteína mutante GST-GK(p.Ile19Asn) presenta una inactiva-

ción más lenta que el resto de las proteínas, disminuyendo su actividad un 30% en los primeros 45 minutos. Sin embargo, las proteínas mutantes GST-GK(p.Phe150Tyr), GST-GK(p.Val154Leu), GST-GK(p.Val302Glu), GST-GK(p.Arg303Trp) y GST-GK(p.Arg308Trp) presentan una reducción más brusca en su actividad, entre un 40% y 70% en los primeros 15 minutos de incubación, disminuyendo hasta el 80-95% en los siguientes 30 minutos.

En su conjunto, estos resultados sugieren que las mutaciones p.Ile19Asn, p.Phe150Tyr, p.Val154Leu, p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp inducen cierta inestabilidad proteica en la GK.

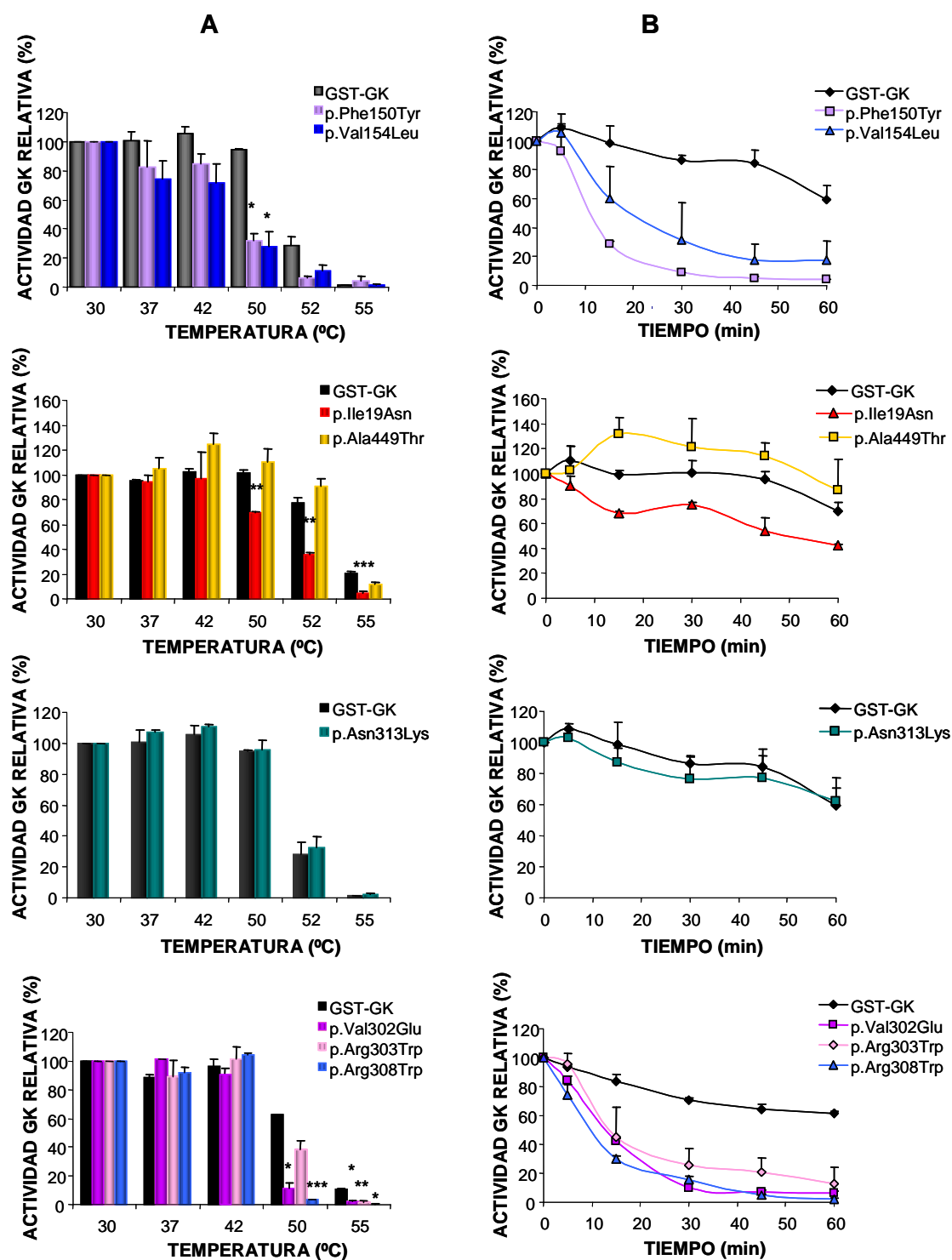


Figura 23. Efecto de la temperatura en la actividad de las proteínas GST-GK y mutantes GST-GK(p.Ile19Asn), GST-GK(p.Phe150Tyr), GST-GK(p.Val154Leu), GST-GK(p.Val302Glu), GST-GK(p.Arg303Trp), GST-GK(p.Arg308Trp), GST-GK(p.Asn313Lys) y GST-GK(p.Ala449Thr). Las proteínas fueron diluidas a 0.25 mg/ml en tampón de congelación (glicerol al 30%, glucosa 50 mM, glutatión 10 mM, DTT 5 mM, KCl 200 mM y Tris/HCl 50 mM (pH 8)). **A.** Las soluciones de las proteínas fueron sometidas a diferentes temperaturas (30 a 55°C) durante 30 min, para luego medir su actividad enzimática a concentraciones saturantes de glucosa (100 mM), tal y como se describe en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos. **B.** Las soluciones de proteína se incubaron a la temperatura crítica de 50°C durante diferentes tiempos en un rango entre 0 y 60 minutos. Los datos expresan la media \pm EEM de dos valoraciones enzimáticas, realizadas por duplicado, con proteínas procedentes de al menos dos purificaciones independientes. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.005$ y (***) $p < 0.0001$.

6. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA GLUCOQUINASA

Tal y como se menciona en la Introducción, se ha descrito que la GK se puede asociar con otras proteínas tales como la proteína reguladora de la GK (GKRP) [120], la enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-quinasa-2,6-bifosfatasa (PF2K-Pasa) [102], la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa [81], la fosfatasa dual DUSP12 [75], el promotor de muerte programada asociado a Bcl-XL/Bcl-2 BAD [88] o el precursor de la subunidad β de la propionil-CoA carboxilasa [89].

A lo largo de este trabajo, se ha estudiado la interacción entre la glucoquinasa y las proteínas DUSP12, BAD, PF2K-Pasa y GKRP mediante ensayos de interacción entre proteínas (*pull-down*) *in vitro*, doble híbrido en levadura o técnicas de inmunoprecipitación de proteínas. Además, se ha analizado el efecto de diversas mutaciones sobre la interacción de la glucoquinasa con las proteínas PF2K-Pasa y GKRP.

6.1. INTERACCIÓN DE LA GLUCOQUINASA CON DUSP12 Y BAD

Los cDNAs humanos para DUSP12 y BAD se clonaron en los plásmidos pGBKT7-DUSP12 y pGBKT7-BAD, según se describe en el apartado 1.1 de Materiales y Métodos. A partir de estos plásmidos se sintetizaron *in vitro* las respectivas proteínas DUSP12 y BAD marcadas con [35 S]metionina, según lo descrito en Materiales y Métodos.

Los ensayos de *pull down in vitro* se llevaron a cabo utilizando proteína DUSP12 y BAD marcadas con [35 S]metionina que se incubaron con cantidades iguales de proteína GST y GST-GK unidas a bolitas de glutation-agarosa, tal y como se indica en el apartado 2.5.3 de Materiales y Métodos. Como se muestra en la Figura 24, la interacción entre GK y DUSP12 resulta ser inespecífica en las condiciones del ensayo, observándose la misma unión de DUSP12 a la fusión GST-GK que a la proteína GST sola, utilizada como control negativo. De forma similar, la interacción entre GK y BAD resulta ser inespecífica (Figura 25) en las condiciones ensayadas que

cubrían un rango de NaCl de 50 a 250 mM, según se describe en Materiales y Métodos.

Para corroborar estos resultados, realizamos ensayos de interacción mediante el sistema de doble híbrido en levadura. Para ello, se transformó la cepa Y187 de *S. cerevisiae* con los plásmidos pACT2-GCK y pGBKT7-BAD o pGBKT7-DUSP12 y se determinó la actividad β -galactosidasa mediante ensayos en filtro de al menos dos transformantes independientes. En estos ensayos tampoco observamos interacción entre las proteínas BAD o DUSP12 y GK (*resultados no mostrados*).

Como se describe en la Introducción, la proteína BAD juega un doble papel en célula β , en la secreción de insulina y en la apoptosis. A concentraciones altas de glucosa, factores de supervivencia celular inducen la fosforilación de BAD en residuos de serina. La fosforilación en la Ser¹⁵⁵ de su dominio BH3 bloquea la capacidad de interacción de BAD con los factores anti-apoptóticos y permite aumentar la fracción de BAD unida a la GK, potenciando la secreción de insulina y la supervivencia celular. Mediante mutagénesis dirigida sustituimos el residuo Ser¹⁵⁵ por un residuo de aspartato, cuya carga negativa pudiera mimetizar los efectos del estado fosforilado.

Para ensayar la interacción entre las proteínas GK y BAD mediante otros abordajes realizamos experimentos de co-inmunoprecipitación de proteínas. Para ello, se transfectaron transitoriamente células HEK293T con los vectores de expresión pEGFP-C3-GCK y pCMV-HA-BAD o mutante pCMV-HA-BAD(p.Ser155Asp) y se obtuvieron extractos celulares tal y como se detalla en el apartado 2.7 de Materiales y Métodos. Como control de la transfección se utilizaron 10 μ l del sobrenadante de los extractos celulares obtenidos para cada uno de los casos, correspondientes al 4% de la proteína total utilizada en los ensayos de co-inmunoprecipitación. El 96% restante de los extractos celulares se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-HA covalentemente inmovilizado con una matriz de proteína-A-sefarosa y tras llevar a cabo los procedimientos descritos en el apartado 2.8 de Materiales y Métodos, las proteínas GFP, GFP-GK, HA-BAD y HA-BAD(p.Ser155Asp) se detectaron mediante *western blot* en el inmunoprecipitado tal y como se describe en el apartado 2.9 de Materiales y Métodos.

En nuestros resultados mostrados en la Figura 26, visualizamos bandas correspondientes a 23, 27 y 77 kDa aproximadamente para el caso de HA-BAD, GFP y GFP-GK, respectivamente, en los controles de transfección (*input* en las Figuras 26A y 26B). Además, observamos una banda de carácter inespecífico para el anticuerpo anti-GFP de menor tamaño que la correspondiente a GFP-GK (*input* en la Figura 26B). En la Figura 26A (*CoIP*) se muestra la detección de la proteína HA-BAD retenida en la matriz de sefarosa-anti-HA. Sin embargo, no visualizamos bandas correspondientes a GFP-GK unida a HA-BAD o HA-BAD(p.Ser155Asp) tras la incubación con el anticuerpo anti-GFP (*CoIP* en la Figura 26B), indicando que ambas proteínas no interaccionan en las condiciones del ensayo.

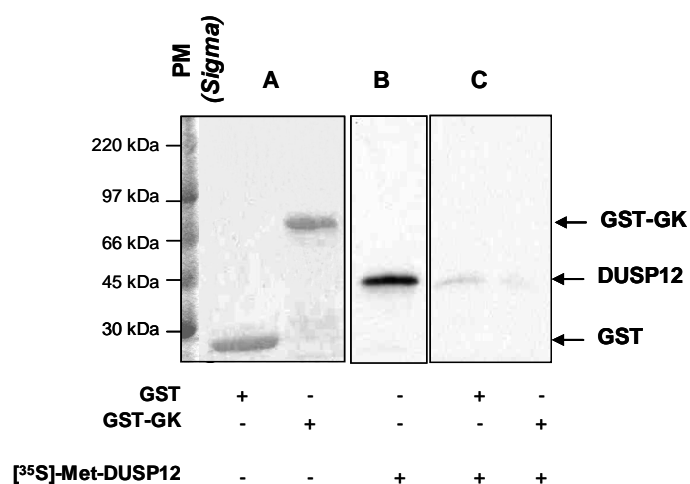


Figura 24. Interacción de la GK con DUSP12 en ensayos de *pull-down in vitro*. En la figura se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes realizados. **A.** SDS-PAGE de la glucoquinasa purificada mediante fusión a GST y posterior tinción con azul de Coomassie. **B.** SDS-PAGE y posterior autorradiografía de [³⁵S]DUSP12 en cantidad correspondiente al 25% de DUSP12 de la utilizada en el experimento. **C.** SDS-PAGE y posterior autorradiografía de la proteína [³⁵S]DUSP12 retenida tras la incubación con las proteínas GST y GST-GK unidas a las bolitas de glutation agarosa. PM: marcador de peso molecular de la casa comercial indicada.

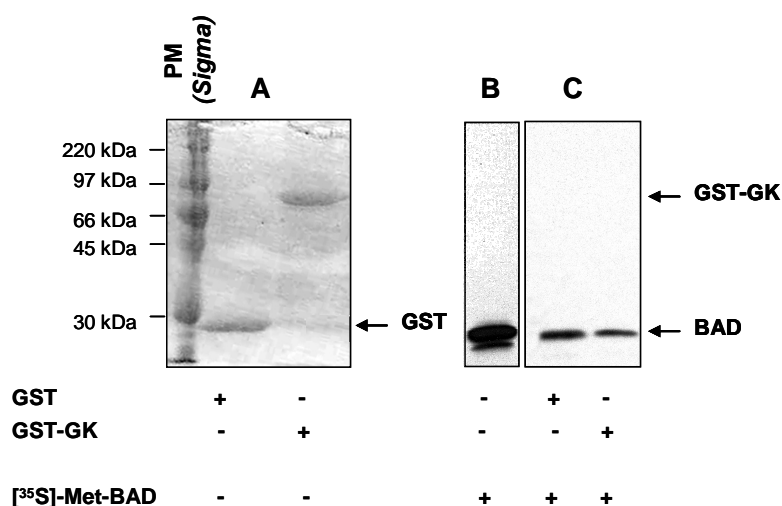


Figura 25. Interacción entre la GK y BAD en ensayos de pull-down in vitro. En la figura se muestra un experimento representativo realizado en un tampón que contenía Tris/HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), DTT 1 mM, NaCl 75 mM, glucosa 25 mM y Tritón X-100 al 0.1%. **A.** SDS-PAGE de la glucoquinasa purificada mediante fusión a GST y posterior tinción con azul de Coomassie. **B.** SDS-PAGE y posterior autorradiografía de [³⁵S]BAD en cantidad correspondiente al 25% de la utilizada en el experimento. **C.** SDS-PAGE y posterior autorradiografía de la proteína [³⁵S]BAD retenida tras la incubación con las proteínas GST y GST-GK unidas a las bolitas de glutation agarosa. PM: marcador de peso molecular de la casa comercial indicada.

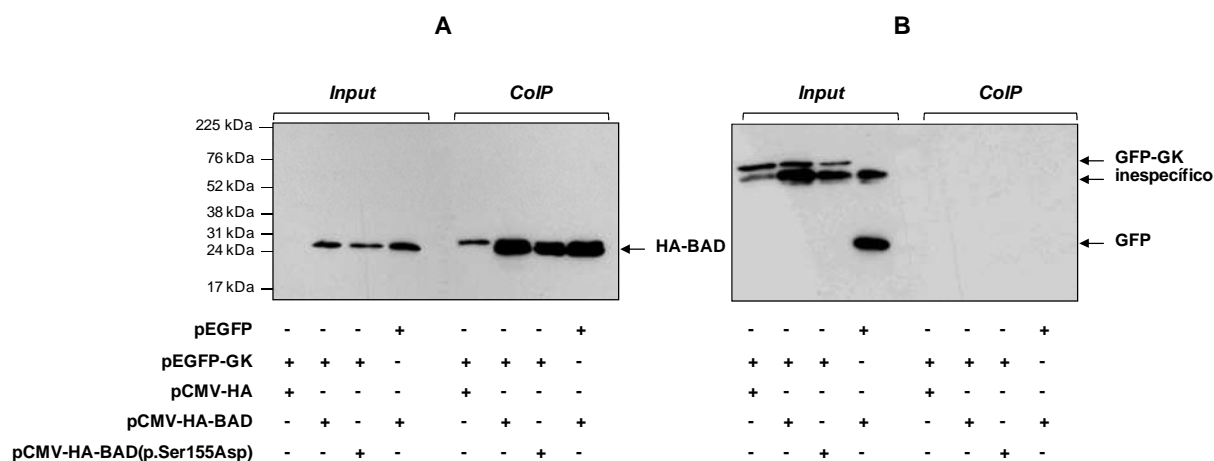


Figura 26. Interacción entre las proteínas GK y BAD en ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas. Células HEK293T fueron co-transfectadas transitoriamente en placas de 60 mm de diámetro con 1.2 µg de DNA del vector de expresión pEGFP-C3-GCK y 4.8 µg del vector pCMV-HA-BAD o pCMV-HA-BAD(p.Ser155Asp). Las células fueron recogidas 42 horas tras la transfección. Se prepararon extractos celulares que se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-HA unido a una matriz de proteína-A-sefaraosa según se describe en el apartado 2.8 de Materiales y Métodos. Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de Immobilon. **A.** Western blot utilizando el anticuerpo anti-HA. Input: 4% de la proteína utilizada en el experimento. CoIP: 10% de las proteínas retenidas en el co-inmunoprecipitado. **B.** Western blot utilizando el anticuerpo anti-GFP N-terminal. Input: 4% de la proteína utilizada en el experimento. CoIP: 90% de las proteínas retenidas en el co-inmunoprecipitado.

6.2. INTERACCIÓN DE LA GLUCOQUINASA CON LA PF2K-Pasa Y LA GKRP

Para analizar el efecto de las mutaciones p.Val302Glu, p.Arg308Trp y p.Asn313Lys sobre la interacción de la GK con las proteínas PF2K-Pasa y GKRP se llevaron a cabo ensayos de *pull-down* según se ha descrito anteriormente. En este estudio se incluyeron además las mutaciones MODY2 p.Asp160_Lys161insAsn, p.Met235Val y p.Arg397Leu identificadas y caracterizadas previamente en nuestro laboratorio [197].

La proteína PF2K-Pasa se sintetizó *in vitro* en presencia de [³⁵S]metionina a partir del plásmido pcDNA3-PFKFB1 según se describe en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos. En este caso, tal y como se muestra en la Figura 27, nuestros resultados indican que la interacción GK-PF2K-Pasa es específica, pero sin embargo, ninguna de las mutaciones analizadas producen un efecto significativo en esta interacción.

Según se describe en la Introducción, la interacción de la GK a su proteína reguladora es la mejor caracterizada de las uniones con proteínas con las que está relacionada. La GKRP actúa como un inhibidor de la GK, competitivo con respecto a la glucosa y además regula la localización núcleo-citoplásmica de la enzima. La interacción entre ambas proteínas se ve favorecida por F6P e inhibida por F1P [120, 123].

En estudios previos se han descrito mutaciones que afectan a residuos alejados espacialmente del centro activo de la GK que producen cambios en la sensibilidad de la enzima glucolítica por su proteína reguladora [211]. Por ello, probamos si las mutaciones p.Val302Glu, p.Arg308Trp, p.Asn313Lys y p.Ala449Thr ejercían algún efecto sobre la interacción entre GK y GKRP mediante ensayos de *pull down in vitro*, de doble híbrido en levadura o en ensayos enzimáticos. En este estudio se incluyeron también las mutaciones MODY2 p.Asp160_Lys161insAsn, p.Met235Val y p.Arg397Leu.

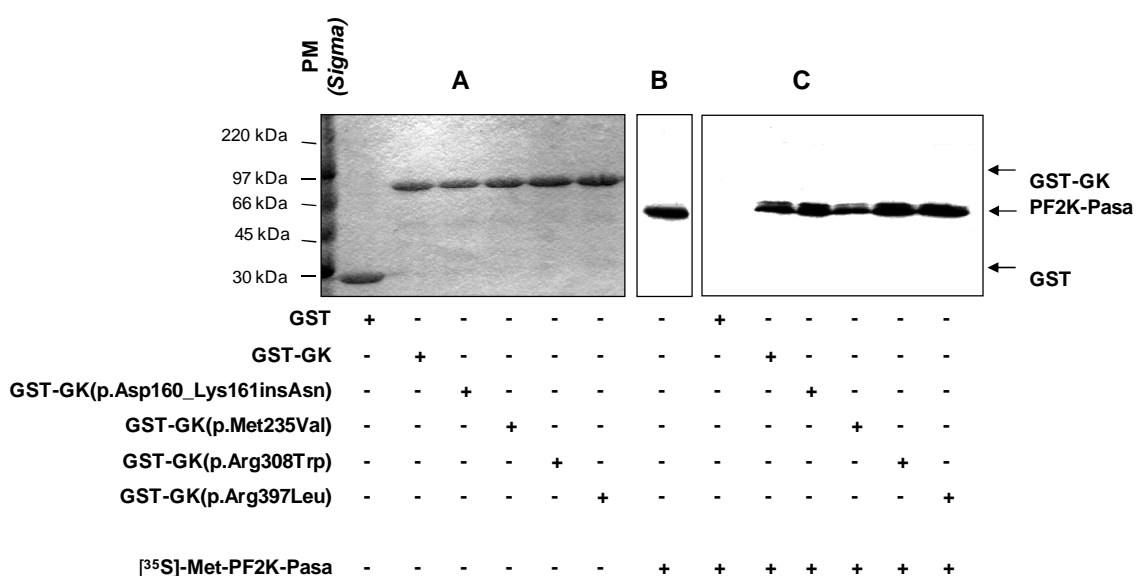


Figura 27. Interacción de la GK silvestre y mutantes con PF2K-Pasa mediante ensayos de pull down in vitro. En la figura se muestra el resultado de un experimento representativo de tres experimentos independientes. En el panel superior se muestra el ensayo realizado para las proteínas mutantes GST-GK(p.Asp160_Lys161insAsn), GST-GK(p.Met235Val), GST-GK(p.Arg308Trp) y GST-GK(p.Arg397Leu). **A.** SDS-PAGE de la glucoquinasa y proteínas mutantes purificadas mediante fusión a GST y posterior tinción con azul de Coomassie. **B.** SDS-PAGE y posterior autorradiografía del 10% de [³⁵S]PF2K-Pasa utilizada en el experimento. **C.** SDS-PAGE y posterior autorradiografía de la proteína [³⁵S]PF2K-Pasa retenida tras la incubación con las proteínas purificadas GST, GST-GK y mutantes. PM: marcador de peso molecular de la casa comercial indicada.

En primer lugar, probamos el efecto de las mutaciones sobre la interacción de la GK con la GKRP mediante ensayos de *pull-down in vitro*. Para ello, cantidades iguales de proteína GST y fusiones GST-GK silvestre y mutantes se incubaron con proteína GKRP sintetizada a partir del plásmido pGBKT7-GCKR y marcada con [³⁵S]metionina, según se describe en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos. Según se muestra en la Figura 28 la interacción física entre ambas proteínas se ve incrementada por las mutaciones p.Arg308Trp y p.Val302Glu, mientras que el resto de mutaciones no parecen afectar a dicha interacción. Estos ensayos se realizaron en dos condiciones distintas. Por un lado, en presencia de F6P y baja concentración de glucosa, condiciones en las que se favorece la interacción entre las dos proteínas y por otro lado, en presencia de F1P y alta concentración de glucosa, condiciones en las que se favorece la separación de ambas. Tal y como se observa en la Figura 28, el efecto de la mutación p.Arg308Trp es aún mayor en presencia de F1P y alta concentración de glucosa.

Para verificar los resultados obtenidos en los experimentos de *pull-down* se llevaron a cabo experimentos complementarios de interacción física entre la GK silvestre y mutantes con la GKRP mediante el sistema del doble híbrido en levadura. En estos ensayos se incluyó además como control la proteína mutante GK(p.Ala456Val), de la que se ha descrito que presenta una menor sensibilidad a la inhibición enzimática ejercida por la GKRP [214]. Para ello, construimos plásmidos que contenían el cDNA de la GK silvestre y mutantes y de la GKRP fusionados a los dominios de activación (GAD) y de unión (GBD) de Gal4, respectivamente y transformamos con ellas la cepa Y187 de *S. cerevisiae* tal como se indica en el apartado 1.2.2 de Materiales y Métodos.

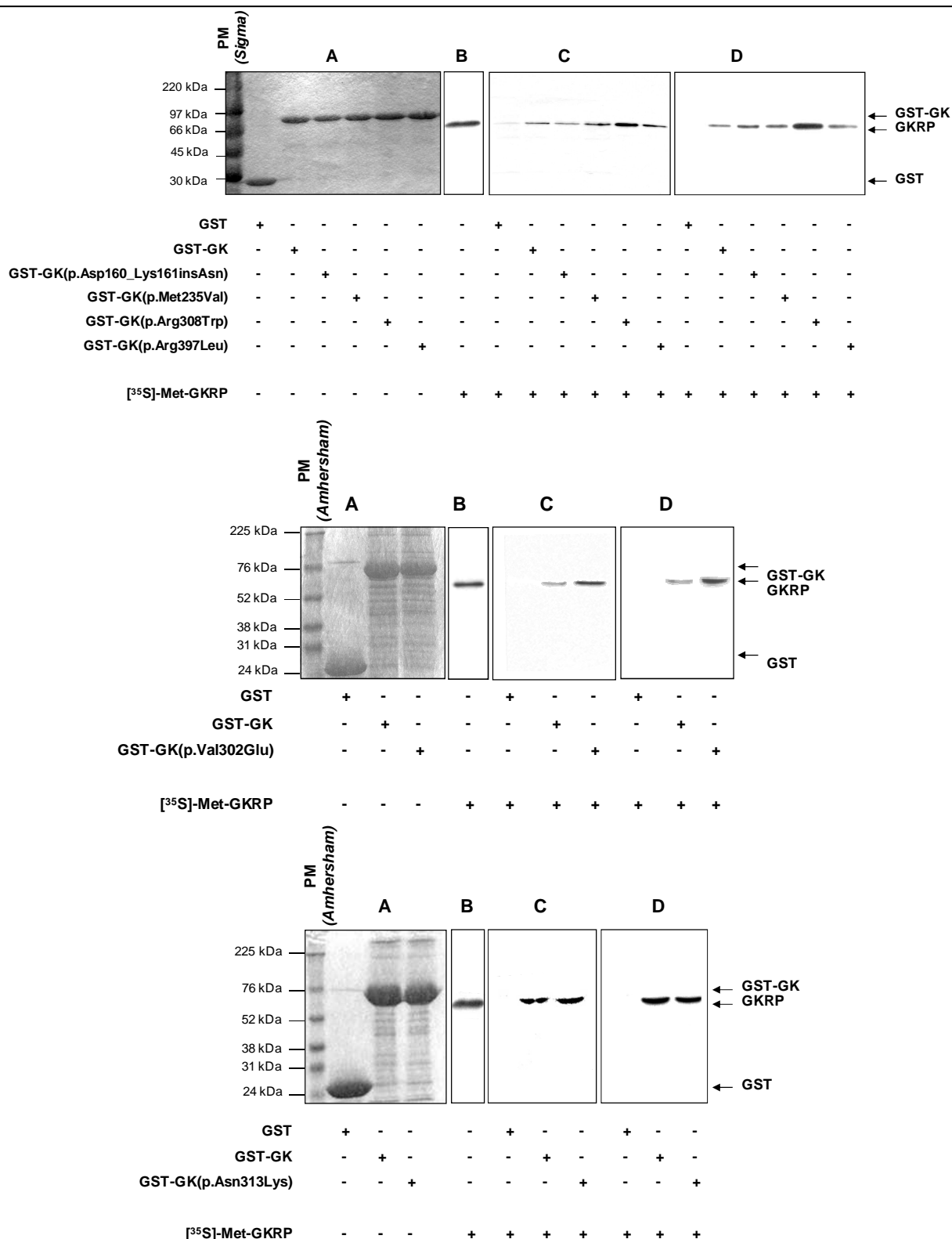


Figura 28. Interacción de la GK y mutantes con GKRP mediante ensayos de pull down in vitro. Se muestra el resultado de un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes. En la figura superior se muestra el ensayo realizado para los mutantes GST-GK(p.Asp160_Lys161insAsn), GST-GK(p.Met235Val), GST-GK(p.Arg308Trp) y GST-GK(p.Arg397Leu); en la figura central para el mutante GST-GK(p.Val302Glu) y en la inferior para GST-GK(p.Asn313Lys). **A.** SDS-PAGE de la glucoquinasa y mutantes purificados mediante fusión a GST y posterior tinción con azul de Coomassie. **B.** SDS-PAGE y posterior autorradiografía del 5% de [³⁵S]GKRP utilizada en el experimento. **C.** y **D.** SDS-PAGE y posterior autorradiografías de la proteína [³⁵S]GKRP retenida tras la incubación con las proteínas purificadas GST, GST-GK silvestre y mutantes en presencia de fructosa-6-fosfato y glucosa 5 mM (**C**) y fructosa-1-fosfato y glucosa 25 mM (**D**). PM: marcador de peso molecular de la casa comercial indicada.

Nuestros resultados, mostrados en la Figura 29, indican que la mutación p.Ala456Val, utilizada como control, produce una ligera, pero significativa, disminución en la unión entre la glucoquinasa y su proteína reguladora. Las mutaciones p.Asn313Lys y p.Ala449Thr no ejercen ningún efecto en dicha interacción. Sin embargo, las mutaciones p.Val302Glu y p.Arg308Trp producen un pequeño pero significativo incremento en la interacción con la GKRP, lo que indica una implicación de los residuos Arg³⁰⁸ y Val³⁰² en la interacción física de la GK con su proteína reguladora.

Debido a los resultados obtenidos en cuanto a la interacción física entre las glucoquinasas mutantes y la GKRP, quisimos complementar estos estudios con ensayos de sensibilidad de la actividad GK a la acción inhibitoria de la GKRP. Para ello, valoramos la actividad enzimática a distintas concentraciones de GKRP y en presencia de F1P o de sorbitol-6-fosfato (S6P), el cual es un análogo de F6P. Comparamos los valores obtenidos con los mutantes a los obtenidos con las proteínas GST-GK y GST-GK(p.Ala456Val) utilizadas como controles.

Según se muestra en la Figura 30, la actividad de la proteína de referencia GST-GK disminuye hasta un 70% a medida que aumenta la concentración de GKRP en presencia de S6P. Sin embargo, en presencia de F1P se mantiene la actividad en más de un 80% a todas las concentraciones de GKRP ensayadas. Las proteínas mutantes GST-GK(p.Asn313Lys) y GST-GK(p.Ala449Thr) presentaban un comportamiento similar a la proteína de referencia, lo que indica que ninguna de estas mutaciones ejercen efecto sobre la inhibición de la actividad GK por la GKRP. A pesar de que la mutación p.Val302Glu ejerce un incremento en la interacción física entre ambas proteínas, este efecto no parece ser significativo en nuestro ensayo de inhibición enzimática. Por otro lado, la proteína que porta la mutación p.Arg308Trp es más sensible a la inhibición por GKRP en presencia de S6P que la proteína de referencia. Además, en presencia de F1P y en concordancia con los resultados observados en ensayos de *pull-down*, la proteína mutante GST-GK(p.Arg308Trp) retiene una mayor sensibilidad a la inhibición por GKRP.

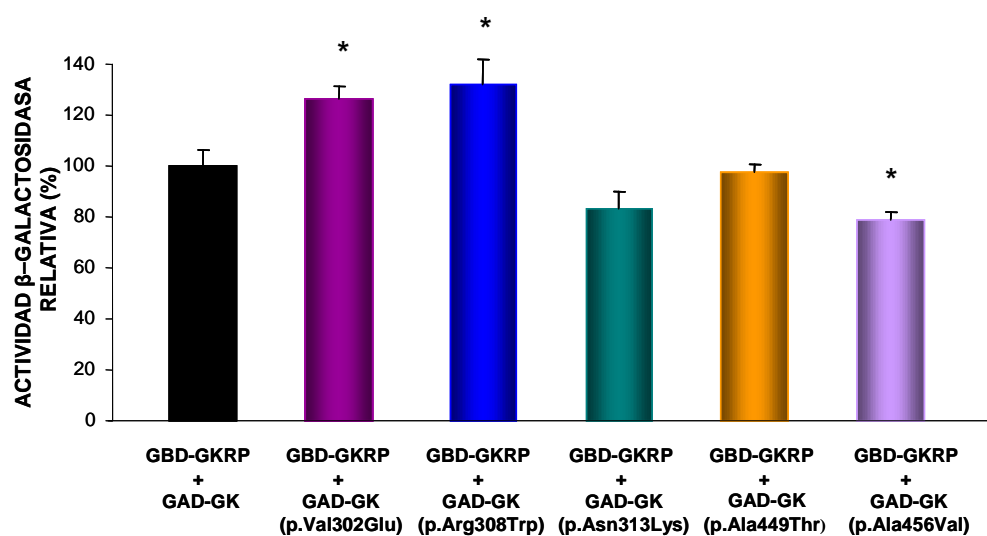


Figura 29. Interacción GK-GKRP mediante ensayos de doble híbrido en levadura. La interacción entre el híbrido del dominio de unión (GBD) de Gal4-GKRP y entre el híbrido del dominio de activación (GAD) de Gal4-GK silvestre y mutantes se estudió en la cepa Y187 de *S. cerevisiae*. Las proteínas de fusión fueron expresadas desde los plásmidos pGBKT7 y pACT2 y la actividad β-galactosidasa fue valorada como se indica en el apartado 1.2.2 de Materiales y Métodos. En experimentos control, GBD-GKRP no interacciona con GAD y GAD-GK no interacciona con GBD. Los valores representados se refieren a los obtenidos para la proteína silvestre y se muestran como medias ± EEM de la actividad β-galactosidasa de al menos 4 transformantes independientes para GK silvestre y mutantes. Los valores de (*) $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

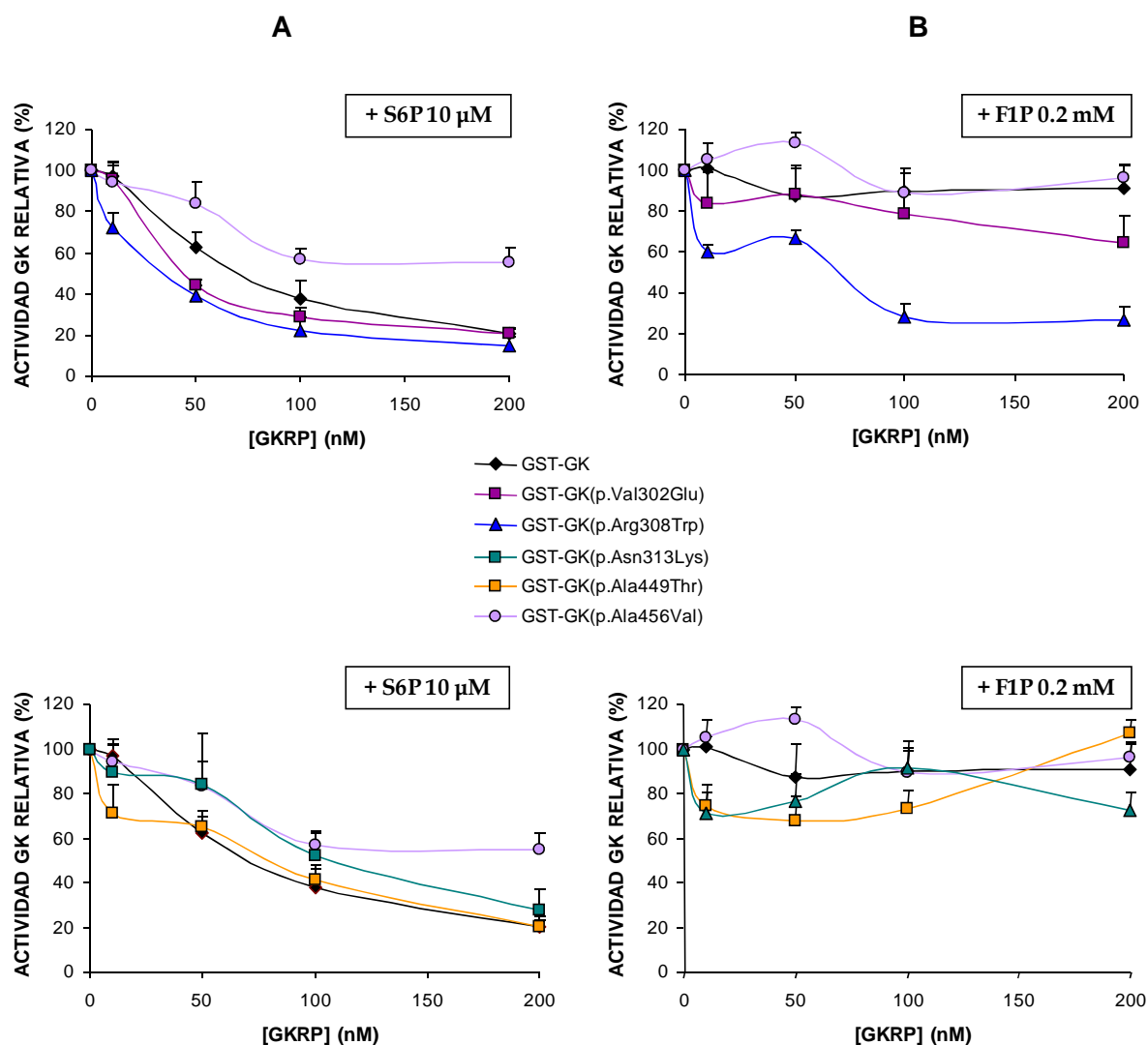


Figura 30. Efecto de la GKRP sobre la actividad GST-GK y mutantes GST-GK(p.Val302Arg), GST-GK(p.Arg308Trp), GST-GK(p.Asn313Lys), GST-GK(p.Ala449Thr) y GST-GK(p.Ala456Val). El ensayo se realizó en presencia de A. sorbitol-6 fosfato (S6P) 10 μ M y B. fructosa-1-fosfato (F1P) 0.2 mM. Los ensayos se llevaron a cabo a una concentración de glucosa de 5 mM y a cuatro concentraciones de GKRP. Los valores representados en las gráficas se refirieron a los valores obtenidos en ausencia de inhibidor (100%) y corresponden a la media y el EEM de los valores obtenidos de al menos seis valoraciones procedentes de tres purificaciones independientes de cada proteína.

7. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA FUNCIÓN DE LA SEÑAL DE EXPORTACION NUCLEAR DE LA GLUCOQUINASA

Los residuos Val³⁰², Arg³⁰³ y Arg³⁰⁸ se localizan dentro de la señal de exportación nuclear (NES) de la GK (Figura 31). Esta señal es necesaria para que la proteína se transloque desde el núcleo al citoplasma [115]. El residuo Asn³¹³ se localiza muy próximo a la secuencia NES. Para analizar el posible efecto de las mutaciones MODY2 p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp y p.Asn313Lys sobre la función de la secuencia NES se introdujeron los cambios correspondientes en el plásmido pEGFP-GCK(p.299-359) que expresa una proteína de fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP que contiene un fragmento de la GK de rata (aminoácidos 299 a 359) fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) [115]. Se transfectaron células Cos-7 y HEK293T con estos plásmidos y se analizó la localización subcelular de la fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP mediante detección de fluorescencia en un microscopio confocal. La distribución de la fluorescencia se comparó a las células transfectadas con los plásmidos pEGFP-GCK(p.299-359)(p.Lys308Arg) y pEGFP-GCK(p.299-359)mt3 utilizados como control. La fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3-GFP contiene una triple sustitución de alanina por leucina en las posiciones 306, 307 y 309, impidiendo la correcta función del sitio NES [115]. En la fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(p.Lys308Arg)-GFP se sustituyó el residuo de lisina en posición 308 presente en la secuencia natural de rata por un residuo de arginina tal y como aparece en la secuencia natural humana (Figura 31).

Según se muestra en las Figuras 32 y 33, la fluorescencia se distribuye de modo homogéneo (se observa con la misma intensidad tanto en el núcleo como en el citoplasma) en alrededor del 90% de las células que expresan la proteína de fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP en ambos tipos celulares. Por el contrario, las células que expresan la fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3-GFP muestran un enriquecimiento de la acumulación de fluorescencia en el núcleo en el 54% y 71% de las células analizadas, en Cos-7 y HEK293T respectivamente, tal y como se había observado anteriormente [115].

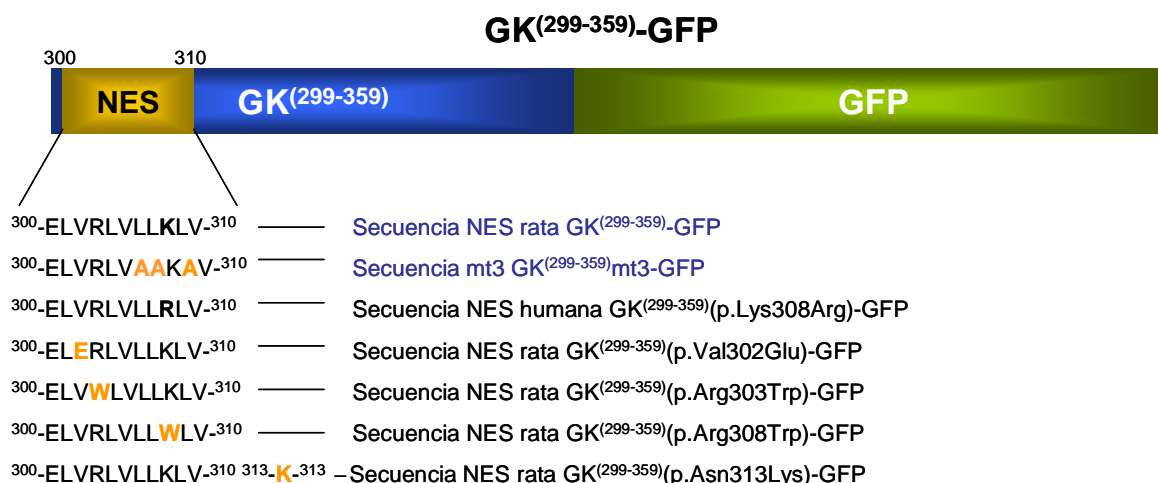
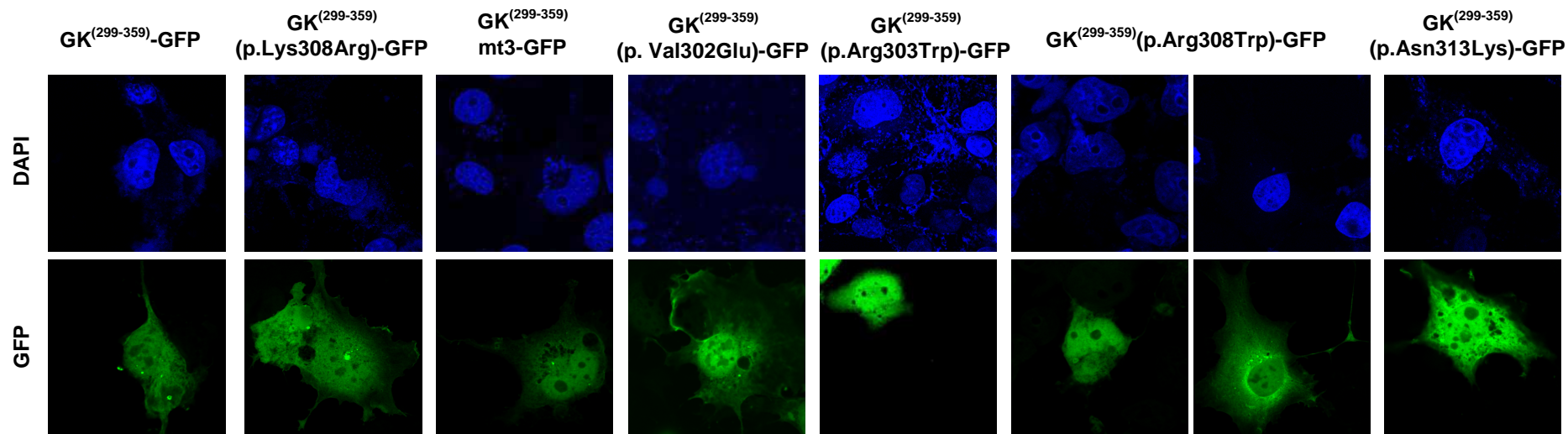


Figura 31. Esquema de la proteína de fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y mutantes. La proteína GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP contiene un fragmento de la GK de rata (aminoácidos 299 a 359) que incluye la secuencia NES (aminoácidos 300 a 310) fusionado a la GFP. Se muestra la secuencia natural de la señal NES de rata y del mutante mt3 [115] y también de los mutantes construidos en este trabajo que contienen la secuencia NES humana y las mutaciones MODY2 p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp y p.Asn313Lys. Se indican los residuos mutados en color naranja.

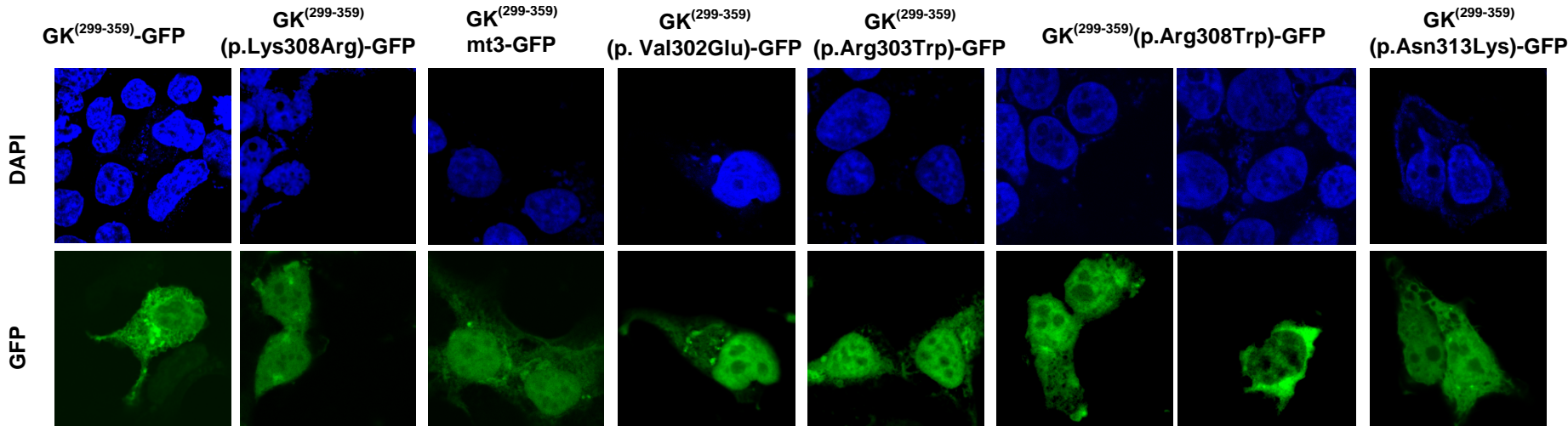
Por otro lado, las células que expresan la proteína de fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(p.Lys308Arg)-GFP y el mutante GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(p.Asn313Lys)-GFP muestran una distribución homogénea de la fluorescencia en el 80-90% de las células. Sin embargo, las fusiones que contienen la mutación p.Val302Glu y p.Arg303Trp presentan un enriquecimiento de fluorescencia en el núcleo en el 70% de las células de ambos tipos celulares. La fusión que contiene la mutación p.Arg308Trp presenta una distribución celular diferente (Figuras 32 y 33). Se observó que el 50% de las células presentaba un enriquecimiento de la fluorescencia en el núcleo y un 30% alrededor de la cara externa de la membrana nuclear. Este tipo de distribución perinuclear no se observa en ninguno de los otros casos.

En conjunto, nuestros resultados indican que las mutaciones MODY2 p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp afectan a la función de la secuencia NES de la GK.



H	86.3 ± 0.5	80.5 ± 4.4	37.0 ± 2.7	29.0 ± 0.4 *	29.2 ± 1.5 *	21.8 ± 1.4 *	84.8 ± 1.2
C	0.2 ± 0.1	8.2 ± 3.2	0	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.2 ± 0.2
N	13.5 ± 0.6	7.8 ± 2.9	54.1 ± 3.2 *	70.5 ± 0.6 *	70.3 ± 1.5 *	46.0 ± 2.1	14.0 ± 1.0
PN	0	3.5 ± 2.6	8.9 ± 4.1	0	0	31.2 ± 0.8 *	0
n	405	400	395	402	424	415	417
DISTRIBUCIÓN DE LA FLUORESCENCIA (% DE CÉLULAS)							

Figura 32. Localización subcelular de las fusiones GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y variantes en células Cos-7. Las células adheridas a cubreobjetos de vidrio fueron transfectadas transitoriamente con 2 µg de los vectores de expresión pEGFP-GCK^(p.299-359), pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Lys308Arg), pEGFP-GCK^(p.299-359)mt3, pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Val302Glu), pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Arg303Trp), pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Arg308Trp) y pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Asn313Lys). 42 horas tras la transfección, las células fueron fijadas y tratadas como se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. Los núcleos celulares se tiñeron de azul con DAPI. Se muestra una imagen representativa de células Cos-7 transfectadas con cada plásmido de cada caso. En la tabla se muestran los valores medios ± EEM (en porcentaje) de células transfectadas con la distribución indicada de la fluorescencia. El número total de células analizadas corresponde a dos transfecciones independientes realizadas por duplicado. Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal de fluorescencia. (*)p<0.0001. H: Homogénea; C: Citoplásmica; N: Nuclear; PN: Perinuclear. n = número total de células analizadas.



H	96.0 ± 0.4	93.0 ± 0.7	27.0 ± 1.1 *	27.0 ± 2.4 *	33.6 ± 3.5	14.25 ± 0.7 *	93.4 ± 0.3
C	1.25 ± 0.2	1.8 ± 0.7	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.4	2.0 ± 0.4	0.5 ± 0.3
N	2.75 ± 0.5	5.2 ± 0.5	71.8 ± 1.4 *	72.2 ± 2.2 *	65.4 ± 3.3	54.75 ± 1.0 *	6.1 ± 0.4
PN	0	0	0.2 ± 0.2	0	0	29.0 ± 1.3	0
n	418	439	413	424	404	360	411
DISTRIBUCIÓN DE LA FLUORESCENCIA (% DE CÉLULAS)							

Figura 33. Localización subcelular de las fusiones GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y variantes en células HEK293T. Las células adheridas a cubreobjetos de vidrio fueron transfectadas transitoriamente con 2 µg de los vectores de expresión pEGFP-GCK^(p.299-359), pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Lys308Arg), pEGFP-GCK^(p.299-359)mt3, pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Val302Glu), pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Arg303Trp), pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Arg308Trp) y pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Asn313Lys). 42 horas tras la transfección, las células fueron fijadas y tratadas como se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. Los núcleos celulares se tiñeron de azul con DAPI. En la tabla se muestran los valores medios ± EEM (en porcentaje) de células analizadas con la distribución indicada de la fluorescencia. El número total de células analizadas corresponde a dos transfecciones independientes realizadas por duplicado. Se muestra una imagen representativa de células HEK293T transfectadas con cada plásmido de cada caso. Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal de fluorescencia. (*)p<0.0001. H: Homógena; C: Citoplásmica; N: Nuclear; PN: Perinuclear; n: número total de células analizadas.

7.1. EFECTO DE LA LEPTOMICINA B SOBRE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA FUSIÓN GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP EN CÉLULAS TRANSFECTADAS

La exportina-1, codificada por el gen *CRM-1* (*chromosome region maintenance 1*), actúa como el principal mediador en la exportación nuclear de macromoléculas en la mayoría de los tipos celulares. La exportina-1 reconoce las secuencias NES en las proteínas a transportar [244, 245]. La leptomicina B es un ácido graso insaturado y ramificado capaz de inhibir la exportación nuclear de la mayoría de macromoléculas, formando un complejo con la exportina-1 para inhibir la interacción de ésta con las señales NES de las proteínas cargo [246, 247].

Para estudiar si la exportación nuclear a través de la secuencia NES de la GK tiene lugar mediante un proceso mediado por el complejo de la exportina-1 y si las mutaciones MODY2 p.Val302Glu, p.Arg303Trp, p.Arg308Trp afectan a este proceso, incubamos las células Cos-7, transfectadas como en el apartado anterior, durante 6 horas en presencia de leptomicina B a una concentración de 40 nM.

Como se muestra en la Figura 34, tras el tratamiento con leptomicina B más del 80% de las células que expresan las fusiones GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(p.Asn313Lys)-GFP presentan un enriquecimiento de la fluorescencia en el núcleo. En las células que expresan las fusiones GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP con las mutaciones MODY2 p.Val302Glu y p.Arg303Trp, el tratamiento con leptomicina B no modifica los resultados obtenidos previamente, detectándose un enriquecimiento de la fluorescencia en el núcleo en alrededor del 70% de las células. Sin embargo, en el caso de la fusión GFP-GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(p.Arg308Trp), el tratamiento con leptomicina B incrementa el porcentaje de células que acumulan la fluorescencia en el núcleo desde un 46% hasta un 67% debido a la reducción en el número de células con fluorescencia perinuclear.

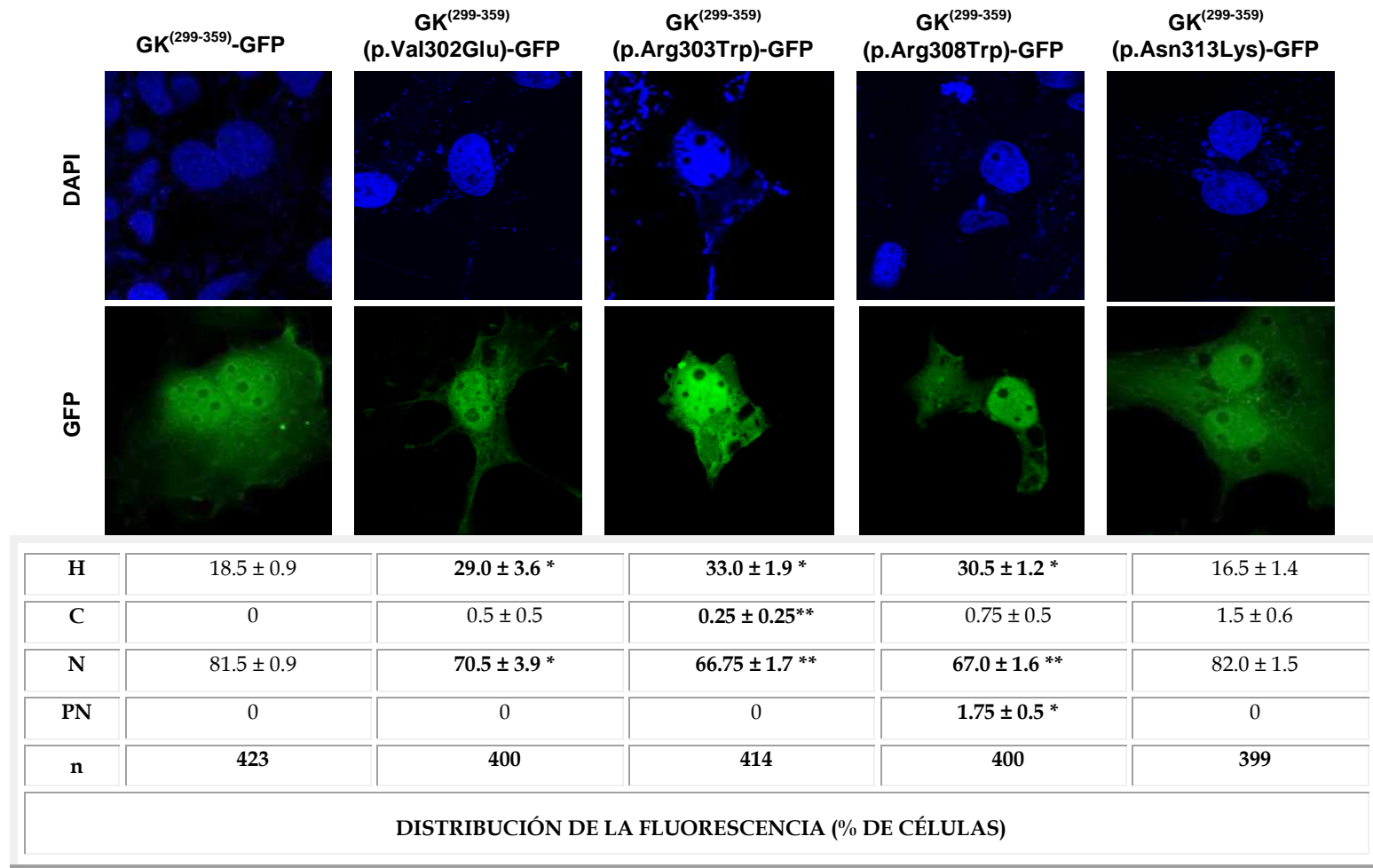


Figura 34. Efecto de la leptomicina B sobre la distribución subcelular de la fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP en células Cos-7. Las células Cos-7 transfectadas con los plásmidos pEGFP-GCK(p.299-359), pEGFP-GCK(p.299-359)(p.Val302Glu), pEGFP-GCK(p.299-359)(p.Arg303Trp), pEGFP-GCK(p.299-359)(p.Arg308Trp) y pEGFP-GCK(p.299-359)(p.Asn313Lys) fueron incubadas, 36 horas tras la transfección, en presencia de 40 nM leptomicina B durante 6 horas. Las células fueron fijadas y tratadas como se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. Los núcleos celulares se tiñeron de azul con DAPI. Se muestra una imagen representativa de cada caso. En la tabla se indican los valores medios ± EEM (en porcentaje) del número de células con la indicada distribución de la fluorescencia. El número de células totales analizadas proceden de dos transfecciones independientes en duplicado. (*)p<0.006 y (**)p<0.0001. H: Homogénea; C: Citoplásmica; N: Nuclear; PN: Perinuclear; n: número total de células analizadas.

7.2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA EXPORTINA-1 SOBRE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA FUSIÓN GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP EN CÉLULAS TRANSFECTADAS

Para investigar el papel de la exportina-1 en el proceso de exportación nuclear dirigido por la secuencia NES de la GK, sugerido por nuestros resultados en el apartado anterior, se analizó la distribución subcelular de la fluorescencia producida por las fusiones GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP en células HEK293T cotransfectadas con la exportina-1.

Tras la optimización de las condiciones de cotransfección, la línea celular HEK293T se transfectó con los plásmidos pEGFP-GCK^(p.299-359) y pCMV-HA-CRM-1 en proporción 1:4. La GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP fue detectada en las células transfectadas mediante fluorescencia y la exportina-1 fusionada al epítipo HA en el conjunto del cultivo celular mediante *western blot* (Figura 35).

El análisis de la distribución de la fluorescencia en células cotransfectadas mostrado en la Tabla 13 indica que la sobreexpresión de la exportina-1 no afecta a la distribución mayoritariamente homogénea de la GFP, observándose este tipo de localización en un 96% de las células analizadas. Sin embargo, se detecta un aumento significativo de la localización citoplásmica de la fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP en el cultivo celular cotransfectado con pCMV-HA-CRM-1 que aumenta hasta el 46%, disminuyendo el porcentaje de células con distribución homogénea de la fluorescencia (*compárese* Tabla 13 con las Figuras 32 y 33). Estos resultados indican que el efecto de la exportina-1 en el proceso de translocación es independiente de la GFP y específico del fragmento GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾. En el caso de la proteína GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(p.Arg308Trp)-GFP, la sobreexpresión de la exportina-1 incrementa el número de células con acúmulo de fluorescencia citoplásmica hasta el 16%, reduciendo el porcentaje de células con enriquecimiento nuclear. Además, la sobreexpresión de la exportina-1 no parece afectar a la localización perinuclear de la fluorescencia observada en este mutante, sugiriendo que este tipo de distribución es debida a la propia mutación.

En conjunto, nuestros resultados indican que la exportación nuclear dirigida por la secuencia NES de la GK es mediada por el complejo de la exportina-1 y que

este proceso de translocación se ve afectado por la presencia de mutaciones en los residuos Val³⁰², Arg³⁰³ y Arg³⁰⁸.

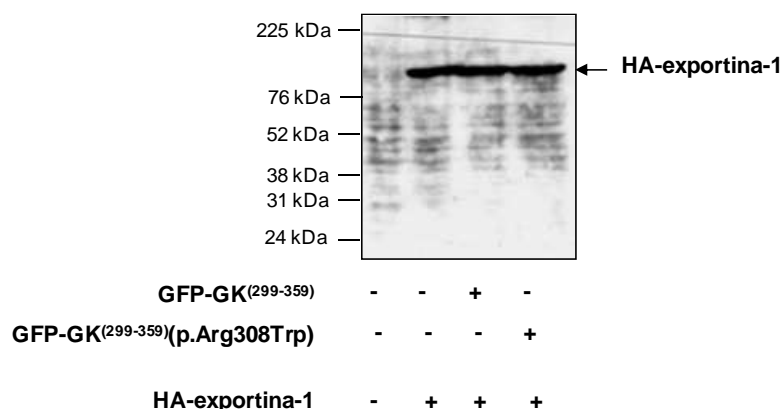


Figura 35. Detección de la exportina-1 fusionada al epítipo HA en cultivos de células HEK293T cotransfectadas. Las células HEK293T fueron cotransfectadas con 2 µg del vector de expresión pCMV-HA-CRM-1 y 0.5 µg de pEGFP-GCK^(p.299-359) o pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Arg308Trp) en placas de 35 mm de diámetro. La exportina-1 fusionada al epítipo HA se identificó en extractos celulares mediante *western blot* utilizando los anticuerpos primario *rat* anti-HA y secundario *goat anti-rat*-HRP. Se visualizó una banda de aproximadamente 112 kDa correspondiente a la proteína HA-exportina-1.

DISTRIBUCIÓN DE LA FLUORESCENCIA (% DE CÉLULAS)

	GFP	GFP + EXPORTINA-1	GK ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ -GFP + EXPORTINA-1	GK ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (p.Arg308Trp)-GFP + EXPORTINA-1
H	95.5 ± 0.4	96.0 ± 0.7	50.5 ± 0.4	25.0 ± 0.7 *
C	0	0	44.5 ± 0.4	15.5 ± 1.7 *
N	4.5 ± 0.4	4.0 ± 0.7	5.0 ± 0.0	24.5 ± 0.4 *
PN	0	0	0	35.0 ± 0.7 *
n	205	216	210	202

Tabla 13. Localización subcelular de GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(p.Arg308Trp)-GFP en cultivos de células HEK293T cotransfectadas con la exportina-1. Las células HEK293T fueron transfectadas con 2 µg del vector de expresión pCMV-HA-CRM-1 y 0.5 µg de pEGFP-GCK^(p.299-359) o pEGFP-GCK^(p.299-359)(p.Arg308Trp). 42 horas tras la transfección, las células fueron fijadas y tratadas como se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. En la tabla se muestran los valores medios ± EEM (en porcentaje) de células transfectadas con la distribución indicada de la fluorescencia. El número total de células transfectadas corresponden a dos transfecciones independientes. (*) $p < 0.0001$.

DISCUSIÓN

La glucoquinasa se ha identificado como una posible diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos antidiabéticos por su gran impacto sobre la homeostasis de glucosa, debido a su papel como sensor de glucosa en la célula β y en el control del metabolismo de este azúcar en el hígado [155]. La importancia de la GK en la homeostasis de glucosa se encuentra avalada por la identificación de mutaciones en su gen, las cuales, dependiendo del efecto que tengan sobre la actividad de la enzima pueden producir hipoglucemia o hiperglucemia [8]. La caracterización funcional de estas mutaciones permite profundizar en la bioquímica y la biofísica de esta enzima e investigar la importancia de la regulación de la glucoquinasa en la homeostasis de glucosa.

En este trabajo se han analizado alguno de los mecanismos de regulación de la GK a partir de la caracterización funcional de doce mutaciones en el gen *GCK*, de las cuales once han sido identificadas en pacientes con hiperglucemia familiar y una en una paciente que presentaba leves episodios de hipoglucemia. Este estudio funcional se ha llevado a cabo analizando el efecto de las mutaciones sobre la estructura proteica y la actividad enzimática. Además se ha analizado su efecto sobre la interacción de la glucoquinasa con otras proteínas y sobre su localización subcelular.

1. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA ESTRUCTURA PROTEICA Y LA CINÉTICA ENZIMÁTICA

Las mutaciones caracterizadas funcionalmente en este trabajo afectan en mayor o menor medida a los parámetros cinéticos de la GK. La localización del residuo mutado en la estructura de la proteína se encuentra estrechamente relacionada con el efecto sobre la actividad catalítica. Así, las mutaciones que afectan a residuos localizados en el centro activo o próximos a él, p.Phe150Tyr, p.Val154Leu, p.Asp205His, p.Gly223Ser y p.His416Arg, afectan gravemente a la actividad global de la enzima, mientras que las mutaciones p.Ile19Asn, p.Ile130Thr, p.Val302Glu, p.Arg303Trp, p.Arg308Trp, p.Asn313Lys y p.Ala449Thr, localizadas en posiciones periféricas, alejadas del centro activo, ejercen un efecto más leve sobre su índice de actividad.

1.1. ANÁLISIS CINÉTICO Y ESTRUCTURAL DE MUTACIONES PRÓXIMAS AL CENTRO ACTIVO

Los residuos Phe¹⁵⁰, Val¹⁵⁴, Asp²⁰⁵, Gly²²³ e His⁴¹⁶ se encuentran altamente conservados interespecíficamente entre glucoquinasas y hexoquinasas y de acuerdo a su localización en el modelo estructural de la GK humana, son residuos esenciales para el mantenimiento de la actividad GK, tal y como demuestra el efecto negativo producido por sus mutaciones.

La mutación p.Asp205His inactiva completamente la enzima. Este resultado era esperable, ya que la unión de la glucosa al residuo Asp²⁰⁵ es necesaria para que tenga lugar el cambio conformacional desde la forma super-abierta inactiva a la forma abierta activa de la enzima [20, 49].

Por otro lado, las mutaciones p.Gly223Ser y p.His416Arg afectan gravemente a todos los parámetros cinéticos de la enzima, aunque de una manera menos drástica que la mutación p.Asp205His. A pesar de que los residuos Gly²²³ e His⁴¹⁶ no establecen contacto directo con la glucosa, forman parte del bolsillo catalítico [20, 49, 54, 248]. El cambio del residuo de histidina por otro de mayor tamaño como la arginina podría producir impedimentos estéricos con residuos en hélices α cercanas que obligarían a una reorganización estructural de esta región de la proteína (Figura 37), lo que explicaría los fuertes efectos causados por esta mutación en la actividad enzimática. En la mutación p.Gly223Ser, la sustitución de la glicina por otro residuo de mayor tamaño como la serina podría también producir impedimentos estéricos con dos de los residuos adyacentes, Thr²⁰⁶ y Met²¹⁰, situados en la hélice α -5 localizada en el bolsillo catalítico y con un papel importante en la actividad GK, tal como demuestra la identificación de otras mutaciones en estos residuos que son causantes de diabetes [206, 208-210].

La mutación p.Phe150Tyr introduce un residuo polar en una región hidrofóbica, rica en residuos de fenilalanina, lo que podría desorganizar la estructura de esta región proteica y por ello afectar fuertemente a los parámetros cinéticos de la enzima. Sin embargo, la mutación p.Val154Leu, aunque de carácter más conservativo que la

anterior, podría ser relevante durante la transición conformacional inducida por la unión de los sustratos, ya que la Val¹⁵⁴ es uno de los residuos desplazados en los cambios ocurridos entre las distintas conformaciones de la enzima. Por otra parte, la aparente inestabilidad proteica en función de la temperatura observada en ambos mutantes podría deberse a la pérdida de afinidad por glucosa de las proteínas GST-GK(p.Phe150Tyr) y GST-GK(p.Val154Leu) y en consecuencia, del efecto protector que este sustrato confiere a la enzima *in vitro* [207].

1.2. ANÁLISIS CINÉTICO Y ESTRUCTURAL DE MUTACIONES ALEJADAS DEL CENTRO ACTIVO

Las mutaciones p.Ile19Asn, p.Ile130Thr, p.Val302Glu, p.Arg303Trp, p.Arg308Trp, p.Asn313Lys y p.Ala449Thr, localizadas en regiones periféricas de la proteína, producen efectos más leves sobre la actividad catalítica global de la GK que las mutaciones ubicadas en el centro activo o muy próximas a él.

El residuo Ile¹³⁰ se sitúa en el núcleo hidrofóbico del dominio menor de la GK. La mutación p.Ile130Thr introduce un residuo polar en esta región, lo que altera la estabilidad, la estructura y la dinámica del dominio (Figura 38). De acuerdo con esto, nuestros resultados cinéticos muestran que la reducción en la actividad de la proteína mutante GST-GK(p.Ile130Thr) se debe principalmente a la disminución en el valor de la K_{cat} . A pesar de que esta mutación no afecta a la afinidad de la enzima por glucosa, incrementa la afinidad por su segundo sustrato, ATP. Este incremento también fue observado en una mutación localizada en un residuo adyacente, p.Ser131Pro [249], lo que sugiere una implicación de esta región de la proteína en la regulación de la afinidad de la enzima por ATP.

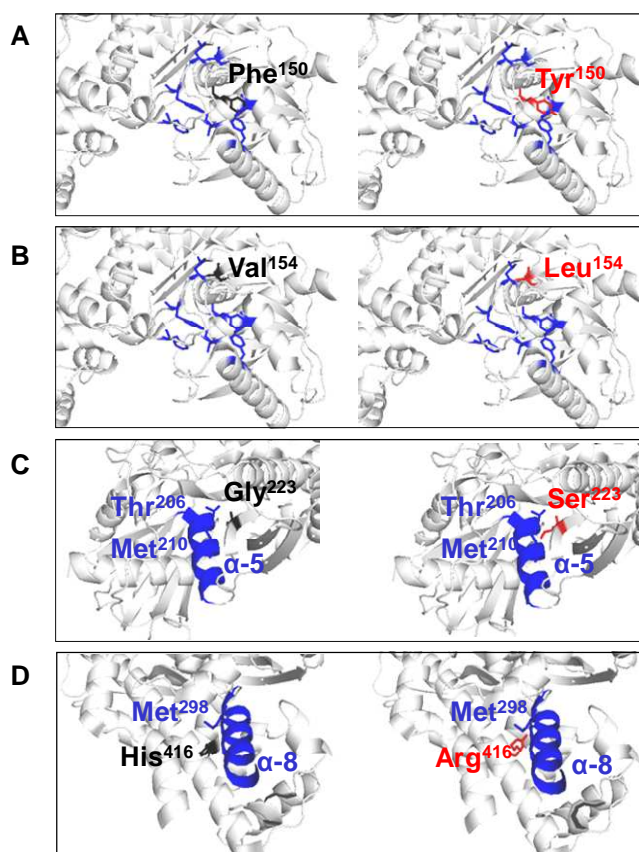


Figura 37. Efecto de las mutaciones p.Phe150Tyr (A), p.Val154Leu (B), p.Gly223Ser (C) y p.His416Arg (D) sobre la estructura de la GK. Se indica la posición de los residuos silvestres (en negro) y mutados (en rojo) en la conformación cerrada de la GK. Los residuos localizados próximos al residuo afectado en las mutaciones se indican en azul. Se muestra una ampliación de la región de interés en cada panel. La conformación cerrada (IV4S) de la GK se representa mediante el programa *Pymol Molecular Graphics System* (Schrödinger).

La mutación p.Ile19Asn implica la sustitución de un residuo hidrofóbico por otro polar en la hélice α -1, en el dominio mayor, lo que podría afectar a la integridad de la estructura de esta región proteica alejada del centro activo (Figura 38). De hecho, nuestros resultados muestran que la reducción en la actividad de la proteína mutante se debe principalmente a la disminución de su K_{cat} y que la mutación p.Ile19Asn causa cierta inestabilidad en la proteína al someterla a la temperatura crítica de 50°C, sin afectar significativamente a la afinidad de la enzima por glucosa.

Los residuos Val³⁰², Arg³⁰³ y Arg³⁰⁸ se encuentran en la hélice α -8, en el dominio mayor de la enzima. A pesar de estar alejadas del sitio activo, nuestros resultados muestran que las mutaciones p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp tienen efec-

tos pequeños, pero significativos, sobre la afinidad de uno o ambos sustratos. Estudios previos han mostrado que otra mutación localizada en la misma hélice, p.Leu309Pro, afecta también a la K_{cat} y a las afinidades por ambos sustratos [206, 250]. Este resultado indicaría que esta región de la proteína podría estar implicada indirectamente en la afinidad de la enzima por glucosa y ATP. Sin embargo, el principal efecto de estas mutaciones está en la K_{cat} . Este efecto podría deberse a un cambio estructural inducido por estas mutaciones. Nuestros resultados indican que las mutaciones p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp causan inestabilidad en la proteína al someterla a la temperatura crítica de 50°C. Además, se ha observado una baja eficiencia en la purificación de estas proteínas mutantes, especialmente de GST-GK(p.Val302Glu) y GST-GK(p.Arg303Trp) al expresarlas en *E.coli*. Este bajo rendimiento en la purificación podría deberse a un incorrecto plegamiento *in vivo* durante la síntesis proteica tal y como se ha propuesto para otra mutación cercana, p.Glu300Lys [207]. La inestabilidad proteica que confieren las mutaciones p.Ile19Asn, p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp podría considerarse como un factor adicional que contribuya a la disminución de la actividad de estas proteínas *in vivo*.

El residuo Asn³¹³, situado en una posición periférica en el dominio mayor contiguo a la hélice α -8, se encuentra conservado solamente entre glucoquinasas. Según el modelo estructural, la cadena lateral del residuo de aminoácido en esta posición se encuentra expuesta al solvente (Figura 38). La sustitución de asparagina por lisina en la mutación p.Asn313Lys tiene como único efecto un ligero aumento en la afinidad por glucosa, que se traduce en un aumento del doble en el índice de actividad de la enzima. Contrariamente a lo que ocurre en el resto de mutaciones analizadas en la misma región, la mutación p.Asn313Lys no disminuye la K_{cat} ni induce inestabilidad proteica a altas temperaturas. Sin embargo, el bajo rendimiento en la purificación tras su expresión en bacteria podría indicar defectos en la expresión de esta proteína *in vivo*, como ya se ha discutido anteriormente para otras mutaciones en la misma región de la proteína.

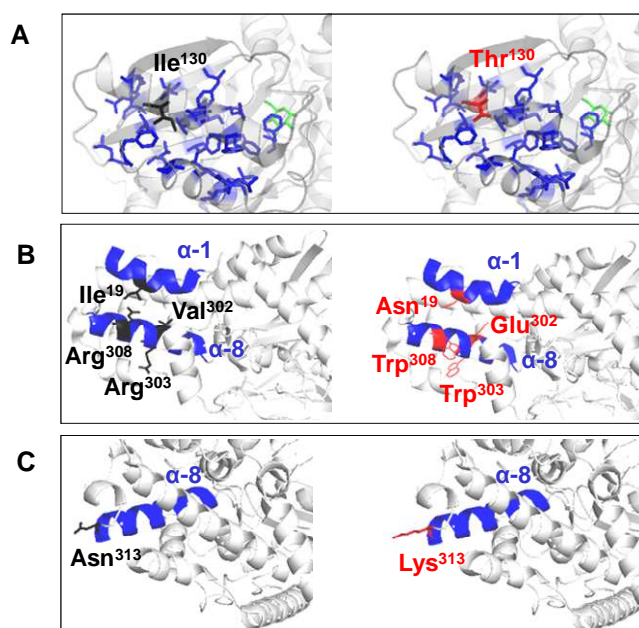


Figura 38. Efecto de las mutaciones p.Ile130Thr (A), p.Ile19Asn, p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp (B) y p.Asn313Lys (C) en la estructura de la GK. Se indica la posición de los residuos silvestres (en negro) y mutados (en rojo) en la conformación cerrada de la GK. Los residuos localizados próximos al residuo de interés se indican en azul. La molécula de glucosa en verde. Se muestra una ampliación de la región de interés en cada panel. La conformación cerrada (IV4S) de la GK se representa mediante el programa *Pymol Molecular Graphics System* (Schrödinger).

Al igual que la mutación p.Asn313Lys, se han descrito otras mutaciones causantes de HI, cuyo estudio cinético muestra un leve efecto activador sobre la actividad GK [185, 188]. Una de estas mutaciones, p.Met197Ile, se localiza en el dominio menor, pero fuera del sitio alostérico donde se agrupan la mayoría de las identificadas hasta el momento (Figura 39). Recientemente se ha publicado la primera mutación activadora de la GK, p.Val389Leu, que se localiza en el dominio mayor de la enzima [186]. La identificación de otras mutaciones activadoras alejadas del sitio alostérico, tales como p.Asn313Lys, avalan la hipótesis de la existencia de sitios reguladores adicionales en la GK [186].

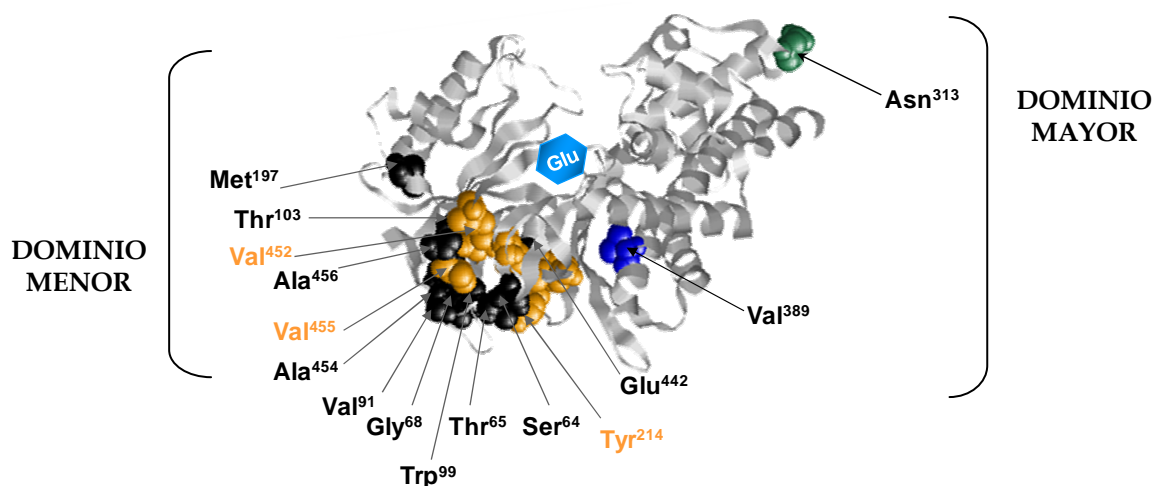


Figura 39. Localización de los residuos afectados en las mutaciones activadoras en el modelo estructural de la GK en conformación cerrada. Los residuos se muestran mediante representación de bolas. La posición de la glucosa se muestra como un hexágono azul. La mayoría de las mutaciones identificadas causantes de HI se localizan en el sitio alostérico de la enzima. Se muestran en color naranja los residuos implicados además en la interacción con el activador GKA [20]. Se indican en azul y en verde los residuos Val³⁸⁹ y Asn³¹³, respectivamente, localizados en el dominio mayor de la GK. Se indican las regiones de la proteína que constituyen los dominios menor y mayor de la enzima.

El índice de actividad obtenido del análisis cinético de estos mutantes es suficiente para explicar el efecto patogénico de estas mutaciones ya que, según lo mencionado en la Introducción, existe una relación directa entre el I_a y el umbral de glucosa necesario para la secreción de insulina en un mutante heterocigoto [206]. En el caso de las mutaciones MODY2 este valor estimado será de al menos 5.5 mM (incluso superior, teniendo en cuenta la inestabilidad proteica inducida por algunas mutaciones) (Figura 40). En el caso de la proteína mutante GST-GK(p.Asn313Lys) el umbral estimado es sólo ligeramente inferior al de la proteína de referencia GST-GK [188, 206, 210], en concordancia con el leve fenotipo clínico de la paciente portadora de la mutación p.Asn313Lys. Debido al hecho de que esta paciente presentara episodios hipoglucémicos más severos tras el inicio de un tratamiento antituberculoso con isoniacida, nos planteamos un posible efecto activador de este antibiótico sobre la actividad GK, hasta el momento desconocido. Sin embargo, en nuestros ensayos no detectamos ningún efecto de la isoniacida sobre la actividad GK que pudiera explicar una activación adicional durante el tratamiento (*resultados no mostrados*).

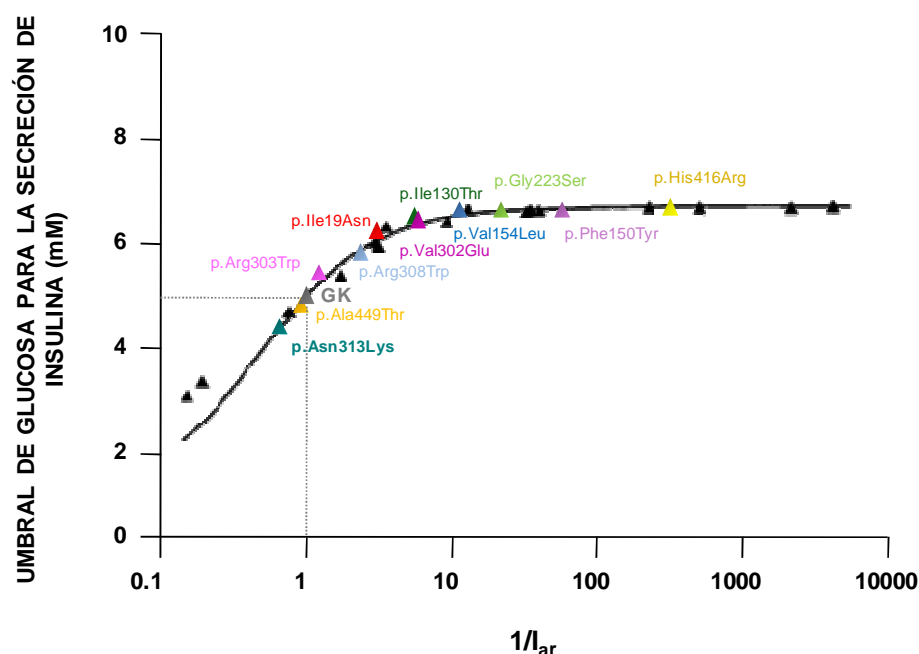


Figura 40. Relación entre el índice de actividad relativo (I_{ar}) de las enzimas silvestre y mutantes y el umbral de glucosa necesario para la secreción de insulina. Sobre la curva que considera la adaptación de la célula β a una situación persistente de hiperglucemia se han interpolado los valores de I_{ar} (en color) obtenidos en nuestros ensayos. Adaptado de [206].

A diferencia del resto de mutaciones analizadas en este trabajo, el índice de actividad global de la proteína mutante GST-GK(p.Ala449Thr) no difiere del de la proteína de referencia GST-GK, a pesar de que sus parámetros cinéticos se encuentran fuertemente alterados, ni tampoco parece estar afectada su estabilidad proteica. El incremento en el valor de la K_m para ATP podría no ser relevante en términos prácticos, ya que su valor es aún inferior a la concentración intracelular de ATP (aproximadamente 2.5 mM) [206]. De forma atípica para una mutación MODY2, p.Ala449Thr incrementa la afinidad por glucosa en casi cinco veces. Este efecto se ve compensado por una reducción en el valor de la K_{cat} y acompañado de una pérdida de cooperatividad, resultando en una eficacia catalítica ($K_{cat}/S_{0.5^h}$) similar a la de la proteína de referencia GST-GK (2.44 ± 0.39 frente a 2.29 ± 0.23). Por tanto, esta mutación elimina las principales características de la GK que permiten que desempeñe su papel como sensor de glucosa: baja afinidad y cooperatividad por este sustrato.

El residuo Ala⁴⁴⁹ se localiza en la hélice α -13 en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica de la enzima. Esta hélice, que forma parte del sitio alostérico de la GK, juega un papel crucial en el cambio conformacional de la enzima tras la unión a glucosa, al pasar desde su conformación inactiva a la activa [20]. Se han descrito mutaciones en esta hélice que incrementan la afinidad de la enzima por glucosa y alteran las interacciones con residuos adyacentes o su flexibilidad, favoreciendo la conformación cerrada de la enzima [251]. Acorde con el modelo estructural de la GK [20], la cadena lateral de la alanina o de la treonina en posición 449 de la cadena polipeptídica de la enzima se proyecta hacia el solvente en su conformación superabierta. Sin embargo, en la conformación cerrada, estos residuos se encuentran enfrentados a las láminas β del dominio menor de la GK, sugiriendo que la cadena lateral de la treonina, de carácter polar y más voluminosa que la de la alanina, podría alterar el equilibrio entre los estados conformacionales de la enzima (Figura 41). El incremento en la afinidad por glucosa mostrado por la proteína mutante GST-GK(p.Ala449Thr), sugiere que la mutación p.Ala449Thr estabiliza la conformación cerrada de la enzima. Esta hipótesis se encuentra avalada por el aumento en la sensibilidad de la proteína mutante al inhibidor MH, que se une al sitio catalítico de la enzima en su conformación cerrada [242].

Se ha postulado que otro inhibidor de la enzima, el palmitoil-CoA, podría unirse a un sitio diferente al que lo harían NAG y MH, solapando parcialmente con la región bisagra e interfiriendo con el cierre de la hendidura catalítica de la enzima [83, 211, 242]. Nuestros resultados muestran que las proteínas mutantes GST-GK(p.Gly223Ser) y GST-GK(p.Ala449Thr) presentan un incremento en la sensibilidad de la enzima al palmitoil-CoA, indicando que las mutaciones p.Gly223Ser y p.Ala449Thr afectan al sitio de unión de los acil-CoAs a la enzima. Se han descrito otras mutaciones con un efecto similar, que al igual que p.Gly223Ser y p.Ala449Thr, modifican la afinidad de la enzima por su segundo sustrato ATP, sugiriendo que el sitio de unión de los acil-CoAs podría solapar con el del ATP, debido a la cierta homología estructural entre ambos [37, 211, 242].

Los GKAs evitan que la enzima adopte la conformación super-abierta y estabilizan la conformación abierta, incrementando la afinidad de la enzima por glucosa y la $V_{\text{máx}}$ de la reacción, respectivamente [20]. El activador LY2121260 se une al sitio alostérico de la enzima siguiendo el mismo mecanismo [243]. El hecho de que la mutación p.Ala449Thr disminuya los valores de K_{cat} y $S_{0.5}$ de una manera similar sugiere que estaría promoviendo la unión no productiva de sustrato o el bloqueo en la liberación de los productos de la reacción, G6P y ADP, probablemente debido a una incapacidad de la proteína mutante GST-GK(p.Ala449Thr) para volver a su conformación abierta durante el ciclo catalítico [20]. Consistentemente, hemos observado que el compuesto LY2121260 no ejerce ningún efecto adicional sobre la afinidad por glucosa y tan solo alivia ligeramente el defecto en la constante catalítica.

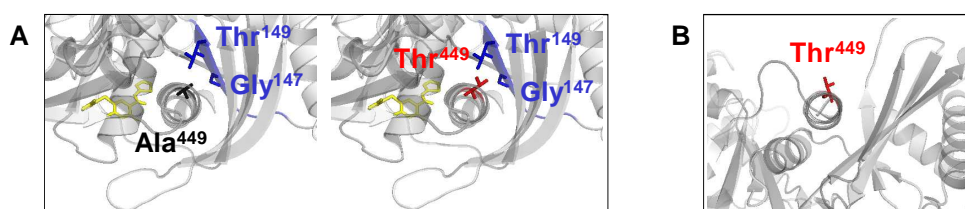


Figura 41. Posición del residuo 449 en las conformaciones cerrada (A) y super-abierta (B) de la GK. Se indica la posición del residuo Ala⁴⁴⁹ silvestre (en negro) y Thr⁴⁴⁹ mutado (en rojo). Los residuos localizados próximos al residuo de interés se indican en azul. En amarillo se muestra el activador GKA [20]. Se muestra una ampliación de la región de interés en cada panel. Las conformaciones cerrada (IV4S) y super-abierta (IV4T) de la GK se representan mediante el programa *Pymol Molecular Graphics System* (Schrödinger).

2. EFECTO DE LAS MUTACIONES SOBRE LA INTERACCIÓN DE LA GLUCOQUINASA CON OTRAS PROTEÍNAS Y SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

La actividad y localización subcelular de la GK es regulada mediante su asociación con otras proteínas, tanto en el hepatocito como en la célula β . De hecho, se han identificado mutaciones que, sin un efecto aparente sobre los parámetros cinéticos de la enzima que pudieran justificar el fenotipo clínico del paciente, afectan sin embargo a la regulación de la GK por interacción con otras proteínas, poniendo de manifiesto la importancia de estos mecanismos de regulación *in vivo* y su papel en la homeostasis de glucosa [97, 133, 134, 197, 209, 211-214, 252]. Para estudiar la posibilidad de que algunas de las mutaciones analizadas en este trabajo causen alteraciones en otros mecanismos de regulación de la actividad GK, adicional al efecto encontrado en la cinética *in vitro*, ensayamos la interacción de esta proteína con otras que se habían descrito asociadas.

A pesar de que estudios previos habían mostrado que la GK interaccionaba con la fosfatasa dual GKAP/DUSP12, mediante ensayos de doble híbrido en levadura [75], nuestros resultados indican que la unión entre ambas proteínas es inespecífica. Esta discrepancia con los resultados publicados previamente podría ser debida al origen distinto de las proteínas utilizadas en los ensayos: rata en aquel caso frente a humano en el nuestro, si bien la proteína DUSP12 de rata mantiene una homología del 82% con la secuencia polipeptídica humana.

Tampoco hemos podido determinar si alguna de las mutaciones afectan a la interacción de la GK con el factor proapoptótico BAD, ya que no hemos encontrado las condiciones óptimas de esta interacción *in vitro*, ni siquiera al sustituir el residuo Ser¹⁵⁵ del dominio BH3 por un residuo de aspartato, cuya carga negativa pudiera mimetizar los efectos de la fosforilación requerida para la función metabólica de BAD con la activación de la GK [100]. Nuestros resultados sugieren que la interacción GK-BAD no sea directa, sino a través de otra u otras proteínas del complejo multiproteico asociado a la mitocondria donde se encuentran ambas proteínas.

Contrariamente a lo observado para las proteínas DUSP12 y BAD, nuestros resultados han corroborado la interacción descrita anteriormente entre la GK y la enzima bifuncional PF2K-Pasa y también entre la GK y la GKRP. No se conocen las regiones proteicas de la GK implicadas en la interacción con la PF2K-Pasa, aunque se han descrito varias mutaciones MODY2 que disminuyen la interacción entre ambas proteínas. Estas mutaciones están localizadas en diversas regiones, próximas al sitio alostérico o en el dominio mayor de la GK [134, 212]. A pesar de que algunas de las mutaciones ensayadas en este trabajo se localizan en esas regiones de la proteína, en nuestros ensayos no detectamos ningún efecto ejercido por estas mutaciones sobre la interacción de la GK con la PF2K-Pasa.

La unión de la GKRP a la GK es responsable de la inhibición de la enzima y de su translocación al núcleo en el hepatocito. La localización núcleo-citoplásmica de la GK forma parte de los mecanismos de regulación que controlan su actividad en este tipo celular. La entrada de proteínas al núcleo y su salida a través del complejo del poro nuclear es un proceso altamente regulado. Las proteínas con un tamaño mayor del límite de exclusión del poro (≈ 40 kDa) entran al núcleo por un mecanismo de transporte activo en el que intervienen secuencias NLS en la secuencia polipeptídica de la proteína a transportar. En ausencia de estas señales, las proteínas entran al núcleo gracias a la interacción con otras proteínas. De forma análoga, la exportación de proteínas desde el núcleo al citoplasma es un proceso activo, mediado por las exportinas, que depende de la presencia de señales NES [244, 253]. De este modo, la presencia o ausencia de las señales NLS o NES, así como su funcionalidad (debido a que podrían estar enmascaradas por cambios conformacionales o por la unión con otras proteínas) causan alteraciones dinámicas en la distribución subcelular de diversas proteínas. En el caso de la GK, que carece de señales NLS, su entrada al núcleo es regulada por la interacción con la proteína reguladora GKRP que sí posee secuencia NLS. Sin embargo, la GK podría ser translocada al citoplasma gracias a la exposición de una señal NES en su propia secuencia [115].

Aunque la importancia fisiológica de la regulación de la GK mediada por la GKRP es bien conocida, no se han definido con exactitud los residuos de aminoácido

implicados en la interacción entre ambas proteínas. Se han descrito algunas mutaciones en la GK que afectan a esta regulación [133, 186, 197, 209, 211-214, 252]. La mayoría de ellas disminuyen la inhibición de la GK por su proteína reguladora y se posicionan en el dominio mayor, en la región bisagra y en el sitio alostérico. Nuestros ensayos muestran que la mutación p.Asn313Lys no ejerce ningún efecto sobre la interacción entre ambas proteínas a pesar de que se había descrito previamente que la sustitución del residuo Asn³¹³ por uno de tirosina producía un incremento en la interacción GK-GKRP en ensayos de doble híbrido en levadura [133]. En este trabajo demostramos que la mutación p.Arg308Trp incrementa la fuerza de interacción física y la sensibilidad a la inhibición enzimática de la GK por la GKRP. Además, este efecto parece ser independiente del estado conformacional de la proteína reguladora, como indica el resultado de nuestros ensayos en presencia de F1P o de S6P. Aunque más moderado, el efecto de la mutación p.Val302Glu apunta en la misma dirección. En estudios previos, se había descrito que la sustitución del residuo Leu³⁰⁹, localizado en la misma hélice α , por prolina afectaba también a la interacción de la GK con la GKRP en ensayos de doble híbrido en levadura pero, en este caso, disminuyéndola [133]. En conjunto, estos resultados indican una implicación de esta región del dominio mayor de la proteína en la interacción de la GK con su proteína reguladora GKRP. Es importante destacar que además esta región contiene una señal de exportación nuclear.

Las señales NES son pequeños motivos ricos en leucina, que tienen como secuencia consenso LX₂₋₃LX₂₋₃LXL, siendo variable el número de residuos de leucina en dicha secuencia. Se ha demostrado que la sustitución de alaninas por leucinas en estas secuencias NES hace que se elimine su funcionalidad [254]. Estudios realizados por *Shiota y cols* en 1999 demostraron que la GK contiene una secuencia NES funcional que comprendía los residuos 300 a 310 ³⁰⁰ELVRLVLLK/RLV³¹⁰ (K o R en rata o humano, respectivamente) y que perdía su función al sustituir las leucinas en posición 306, 307 y 309 por alaninas [115].

Los residuos Val³⁰², Arg³⁰³ y Arg³⁰⁸, sustituidos en las correspondientes mutaciones MODY2, forman parte de la señal de exportación nuclear de la GK. Hemos

analizado el efecto causado por las mutaciones MODY2 p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp sobre la funcionalidad de la secuencia NES de la GK, utilizando un sistema de estudio desarrollado previamente por el grupo de *M. Magnuson* [115]. En este sistema se utilizan plásmidos de expresión para una proteína que contiene los residuos 299 a 359 de la GK fusionados a la GFP. Hemos podido reproducir las observaciones de esos autores en dos líneas celulares distintas. El pequeño tamaño de las proteínas de fusión (34 kDa) les permite difundir libremente dentro del núcleo. La presencia de una señal NES funcional posibilita su exportación desde el núcleo al citoplasma. Así, la distribución de la fluorescencia es homogénea en aquellas células que expresan la proteína de fusión con la señal NES de rata o humana intacta. Por el contrario y confirmando las observaciones previas, la triple sustitución de leucina por alanina en las posiciones 306, 307 y 309 en el caso del mutante mt3 afecta a la funcionalidad de la secuencia NES, provocando un acúmulo de la proteína GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3-GFP en el núcleo [115].

El mecanismo de exportación nuclear de la GK no está del todo establecido, debido a la distinta consideración de la implicación de las exportinas y de la GKRP en este proceso [39]. Existe controversia acerca de si el complejo GK-GKRP puede disociarse en el núcleo seguido de la exportación de la GK y la GKRP como proteínas independientes o si puede ser exportado del núcleo como un complejo que posteriormente se disocia en el citoplasma [114, 129-132, 255-257]. La identificación de una señal NES funcional apoya la idea de la exportación de la GK tras su disociación de la GKRP y un papel de las exportinas en este proceso [115].

Hemos observado que las mutaciones p.Val302Glu, p.Val303Trp y p.Arg308Trp producen defectos en la exportación nuclear de la proteína de fusión GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP, indicando que afectan a la funcionalidad de la secuencia NES de la GK. Además, nuestros resultados sugieren que el defecto causado por la mutación p.Arg308Trp podría ser distinto al causado por las mutaciones p.Val302Glu o p.Val303Trp.

El proceso de exportación nuclear requiere de un conjunto de proteínas, que incluye receptores, proteínas reguladoras y cofactores, para permitir el transporte de

macromoléculas a través del poro nuclear [258]. En este proceso, las exportinas actúan de receptor, reconociendo las señales NES en las moléculas a transportar. La exportina-1 es el principal mediador en la exportación nuclear en la mayoría de los tipos celulares [245]. Aunque existe controversia acerca de su implicación en la exportación nuclear de la GK, nuestros resultados indican que la exportación desde el núcleo al citoplasma, mediada por la secuencia NES de la GK, es bloqueada por la leptomicina B. De manera complementaria, hemos observado que la sobreexpresión de la exportina-1 promueve la acumulación de fluorescencia en el citoplasma en las células que expresan las fusiones GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP, demostrando un papel de la exportina-1 en este proceso de translocación. El hecho de que la leptomicina B elimine la localización perinuclear de GK⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(p.Arg308Trp)-GFP, pero la sobreexpresión de la exportina-1 no lo modifique, sugiere que esta mutación afecte a la interacción con otras proteínas del complejo de exportación.

Por tanto, nuestros resultados sugieren que las mutaciones MODY2 p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p. Arg308Trp, pueden afectar a la compartimentación subcelular de la glucoquinasa *in vivo*. Una mayor fuerza de unión a la proteína reguladora mantendría a la glucoquinasa en el núcleo en su forma inactiva. Adicionalmente, una señal NES defectuosa dificultaría su translocación al citoplasma. Esto tendría como consecuencia una menor actividad GK *in vivo* que la inferida únicamente de los ensayos cinéticos realizados *in vitro*. Teniendo en cuenta el importante papel que juega la GKRP y la localización núcleo-citoplásmica en la regulación de la GK hepática, estos defectos producirían una mayor desregulación del metabolismo de la glucosa en el hígado, lo cual contribuiría en mayor medida a la hiperglucemia en los pacientes portadores de estas mutaciones.

En resumen, los resultados de este trabajo, realizado a partir del estudio de mutaciones naturales identificadas en pacientes con alteraciones en la homeostasis de glucosa, ponen de manifiesto la importancia del ajuste fino de las características cinéticas y estructurales de la glucoquinasa para su función como sensor de glucosa en la célula β pancreática. Además han permitido dilucidar nuevos aspectos de la regulación de la GK de especial importancia en el hepatocito.

CONCLUSIONES

- Las mutaciones que afectan a residuos localizados en el centro activo, o próximos a él, disminuyen drásticamente la actividad global de la glucoquinasa. El principal efecto de estas mutaciones es inducir una fuerte reducción en la afinidad por la glucosa al desestructurar el bolsillo catalítico.
- Las mutaciones localizadas en residuos periféricos afectan de manera más leve a la actividad catalítica global de la enzima y su efecto sobre los distintos parámetros cinéticos es variable. En la mayoría de los casos, inducen además inestabilidad proteica.
- El índice de actividad global, obtenido del análisis cinético de los mutantes, es suficiente para explicar el efecto patogénico de las mutaciones en la mayoría de los casos, pero no en todos. La mutación MODY2 p.Ala449Thr, localizada en el sitio alostérico de la glucoquinasa, no modifica el índice de actividad global de la enzima a pesar de modificar fuertemente todos los parámetros cinéticos. Su efecto consiste en alterar el equilibrio entre los estados conformacionales de la enzima, estabilizando la conformación cerrada. Esta mutación subraya la importancia de mantener las características cinéticas de la glucoquinasa (baja afinidad por glucosa y cooperatividad por este sustrato) para desempeñar su papel como sensor de glucosa en la célula β pancreática.
- La mutación p.Asn313Lys ejerce un suave efecto activador sobre la glucoquinasa al inducir un ligero aumento en la afinidad por glucosa, acorde con el leve fenotipo hipoglucémico de la paciente portadora. Esta mutación se localiza alejada del resto de las activadoras y de los principales sitios de la enzima, activo y alostérico.
- Mediante la metodología utilizada en este trabajo no se ha detectado interacción directa de la glucoquinasa con las proteínas DUSP12 y BAD, aunque sí con la PF2K-Pasa y la GKRP. Ninguna de las mutaciones analizadas afecta a la interacción de la GK con la PF2K-Pasa, indicando que los residuos mutados no están implicados en esta interacción.

- Las mutaciones MODY2 p.Val302Glu y p.Arg308Trp incrementan la fuerza de interacción de la GK con la GKRP. En el caso de la mutación p.Arg308Trp este efecto es más patente en presencia de F1P y alta concentración de glucosa, condiciones en las que normalmente se promueve la disociación.
- El proceso de exportación nuclear dirigido por la secuencia NES de la glucoquinasa (residuos 300 a 310) es mediado por la exportina-1. Este proceso está afectado por las mutaciones p.Val302Glu, p.Arg303Trp y p.Arg308Trp.
- La caracterización funcional de las mutaciones ha permitido identificar la hélice $\alpha 8$ como una región proteica con un importante papel regulador de la actividad glucoquinasa. Mutaciones en esta región, alejada del centro activo y del sitio alostérico, pueden afectar a los parámetros cinéticos y a la estabilidad proteica. Además, pueden alterar la distribución núcleo-citoplásmica de la enzima, mecanismo de regulación de especial relevancia en ciertos tipos celulares como el hepatocito.

BIBLIOGRAFÍA

1. G. Jiang and B.B. Zhang, "Glucagon and regulation of glucose metabolism", *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(2003) E671-678.
2. S. Aronoff, K. Berkowitz, B. Shreiner and L. Want, "Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon ", *Diabetes Spectrum* 17(2004) 183-190.
3. F.M. Matschinsky, M.A. Magnuson, D. Zelent, T.L. Jetton, N. Doliba, Y. Han, R. Taub and J. Grimsby, "The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy", *Diabetes* 55(2006) 1-12.
4. D.G. Walker and S. Rao, "The role of glucokinase in the phosphorylation of glucose by rat liver", *Biochem J* 90(1964) 360-368.
5. A. Sols, M. Salas and E. Vinuela, "Induced biosynthesis of liver glucokinase", *Adv Enzyme Regul* 2(1964) 177-188.
6. C. Sharma, R. Manjeshwar and S. Weinhouse, "Hormonal and dietary regulation of hepatic glucokinase", *Adv Enzyme Regul* 2(1964) 189-200.
7. F.M. Matschinsky and J.E. Ellerman, "Metabolism of glucose in the islets of Langerhans", *J Biol Chem* 243(1968) 2730-2736.
8. K.K. Osbak, K. Colclough, C. Saint-Martin, N.L. Beer, C. Bellanne-Chantelot, S. Ellard and A.L. Gloyn, "Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia", *Hum Mutat* 30(2009) 1512-1526.
9. F.M. Matschinsky, B. Zelent, N.M. Doliba, K.H. Kaestner, J.M. Vanderkooi, J. Grimsby, S.J. Berthel and R. Sarabu, "Research and development of glucokinase activators for diabetes therapy: theoretical and practical aspects", *Handb Exp Pharmacol*(2011) 357-401.
10. M. Cardenas, "'Glucokinase': its regulation and role in liver metabolism.", *Molecular Biology Intelligence Unit. Lands RG, Ed Austin, TX, Springer.*(1995) 210.
11. A. Cornish-Bowden and M.L. Cardenas, "Co-operativity in monomeric enzymes", *J Theor Biol* 124(1987) 1-23.

12. K.E. Neet, R.P. Keenan and P.S. Tippet, "Observation of a kinetic slow transition in monomeric glucokinase", *Biochemistry* 29(1990) 770-777.
13. F.J. Bedoya, J.M. Wilson, A.K. Ghosh, D. Finegold and F.M. Matschinsky, "The glucokinase glucose sensor in human pancreatic islet tissue", *Diabetes* 35(1986) 61-67.
14. E. Van Schaftingen, "A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate", *Eur J Biochem* 179(1989) 179-184.
15. P. Froguel, M. Vaxillaire, F. Sun, G. Velho, H. Zouali, M.O. Butel, S. Lesage, N. Vionnet, K. Clement, F. Fougerousse and et al., "Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus", *Nature* 356(1992) 162-164.
16. A.T. Hattersley, R.C. Turner, M.A. Permutt, P. Patel, Y. Tanizawa, K.C. Chiu, S. O'Rahilly, P.J. Watkins and J.S. Wainscoat, "Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene", *Lancet* 339(1992) 1307-1310.
17. B. Glaser, P. Kesavan, M. Heyman, E. Davis, A. Cuesta, A. Buchs, C.A. Stanley, P.S. Thornton, M.A. Permutt, F.M. Matschinsky and K.C. Herold, "Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation", *N Engl J Med* 338(1998) 226-230.
18. P.R. Njolstad, O. Sovik, A. Cuesta-Munoz, L. Bjorkhaug, O. Massa, F. Barbetti, D.E. Undlien, C. Shiota, M.A. Magnuson, A. Molven, F.M. Matschinsky and G.I. Bell, "Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency", *N Engl J Med* 344(2001) 1588-1592.
19. J. Grimsby, R. Sarabu, W.L. Corbett, N.E. Haynes, F.T. Bizzarro, J.W. Coffey, K.R. Guertin, D.W. Hilliard, R.F. Kester, P.E. Mahaney, L. Marcus, L. Qi, C.L. Spence, J. Teng, M.A. Magnuson, C.A. Chu, M.T. Dvorozniak, F.M. Matschinsky and J.F. Grippo, "Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy", *Science* 301(2003) 370-373.

20. K. Kamata, M. Mitsuya, T. Nishimura, J. Eiki and Y. Nagata, "Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase", *Structure* 12(2004) 429-438.
21. R. Bonadonna, C. Kapitza, T. Heinse, A. Avogaro, M. Boldrin, J. Grimsby, M. Mulligan, C. Arbet-Engles and R. Balena, "Glucokinase activator RO4389620 improves beta cell function and plasma glucose indexes in patients with type 2 diabetes", *Diabetologia* 51 (Suppl I)(2008).
22. J. Zhi, S. Zhai, M. Mulligan, J. Grimsby, C. Arbet-Engles, M. Boldrin and R. Balena, "A novel glucokinase activator RO4389620 improved fasting and postprandial plasma glucose in type 2 diabetic patients", *Diabetologia* 51 (Suppl 1):S23 (Abstract # 42)(2008).
23. F.M. Matschinsky, "Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm", *Diabetes* 45(1996) 223-241.
24. P.B. Iynedjian, "Mammalian glucokinase and its gene", *Biochem J* 293 (Pt 1)(1993) 1-13.
25. M.L. Cardenas, A. Cornish-Bowden and T. Ureta, "Evolution and regulatory role of the hexokinases", *Biochim Biophys Acta* 1401(1998) 242-264.
26. J.E. Wilson, "Hexokinases", *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 126(1995) 65-198.
27. R.L. Printz, M.A. Magnuson and D.K. Granner, "Mammalian glucokinase", *Annu Rev Nutr* 13(1993) 463-496.
28. J.E. Wilson, "The hexokinase gen family", In Magnusom M, Matschinsky F, editors. *Glucokinase and glycemic diseases: from basics to novel therapeutics: Basel: Karger.*(2004) p.92-109.
29. A.C. Storer and A. Cornish-Bowden, "Kinetic evidence for a 'mnemonical' mechanism for rat liver glucokinase", *Biochem J* 165(1977) 61-69.
30. M. Veiga-da-Cunha, S. Courtois, A. Michel, E. Gosselain and E. Van Schaftingen, "Amino acid conservation in animal glucokinases. Identification of residues implicated in the interaction with the regulatory protein", *J Biol Chem* 271(1996) 6292-6297.

31. H. Niemeyer, M. de la Luz Cardenas, E. Rabajille, T. Ureta, L. Clark-Turri and J. Penaranda, "Sigmoidal kinetics of glucokinase", *Enzyme* 20(1975) 321-333.
32. A.C. Storer and A. Cornish-Bowden, "Kinetics of rat liver glucokinase. Co-operative interactions with glucose at physiologically significant concentrations", *Biochem J* 159(1976) 7-14.
33. J. Monod, J. Wyman and J.P. Changeux, "On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model", *J Mol Biol* 12(1965) 88-118.
34. D.E. Koshland, Jr., G. Nemethy and D. Filmer, "Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits", *Biochemistry* 5(1966) 365-385.
35. L.W. Nichol, W.J. Jackson and D.J. Winzor, "A theoretical study of the binding of small molecules to a polymerizing protein system. A model for allosteric effects", *Biochemistry* 6(1967) 2449-2456.
36. M.L. Cardenas, E. Rabajille and H. Niemeyer, "Maintenance of the monomeric structure of glucokinase under reacting conditions", *Arch Biochem Biophys* 190(1978) 142-148.
37. M.A. Moukil and E. Van Schaftingen, "Analysis of the cooperativity of human beta-cell glucokinase through the stimulatory effect of glucose on fructose phosphorylation", *J Biol Chem* 276(2001) 3872-3878.
38. M.L. Cardenas, E. Rabajille and H. Niemeyer, "Suppression of kinetic cooperativity of hexokinase D (glucokinase) by competitive inhibitors. A slow transition model", *Eur J Biochem* 145(1984) 163-171.
39. L. Agius, "Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism", *Biochem J* 414(2008) 1-18.
40. D. Pollard-Knight and A. Cornish-Bowden, "Kinetics of hexokinase D ('glucokinase') with inosine triphosphate as phosphate donor. Loss of kinetic co-operativity with respect to glucose", *Biochem J* 245(1987) 625-629.

41. A. Cornish-Bowden and M.L. Cardenas, "Glucokinase: a monomeric enzyme with positive cooperativity", In Magnusom M, Matschinsky F, editors. *Glucokinase and glycemic diseases: from basics to novel therapeutics*: Basel: Karger. 16(2004) p.125-134.
42. R. St Charles, R.W. Harrison, G.I. Bell, S.J. Pilkis and I.T. Weber, "Molecular model of human beta-cell glucokinase built by analogy to the crystal structure of yeast hexokinase B", *Diabetes* 43(1994) 784-791.
43. L.Z. Xu, W. Zhang, I.T. Weber, R.W. Harrison and S.J. Pilkis, "Site-directed mutagenesis studies on the determinants of sugar specificity and cooperative behavior of human beta-cell glucokinase", *J Biol Chem* 269(1994) 27458-27465.
44. L.Z. Xu, I.T. Weber, R.W. Harrison, M. Gidh-Jain and S.J. Pilkis, "Sugar specificity of human beta-cell glucokinase: correlation of molecular models with kinetic measurements", *Biochemistry* 34(1995) 6083-6092.
45. W.S. Bennett, Jr. and T.A. Steitz, "Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase", *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1978) 4848-4852.
46. W.S. Bennett, Jr. and T.A. Steitz, "Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose. I. Structure determination and refinement at 3.5 Å resolution", *J Mol Biol* 140(1980) 183-209.
47. A.E. Aleshin, C. Zeng, G.P. Bourenkov, H.D. Bartunik, H.J. Fromm and R.B. Honzatko, "The mechanism of regulation of hexokinase: new insights from the crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and glucose-6-phosphate", *Structure* 6(1998) 39-50.
48. A.E. Aleshin, C. Zeng, H.D. Bartunik, H.J. Fromm and R.B. Honzatko, "Regulation of hexokinase I: crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and phosphate", *J Mol Biol* 282(1998) 345-357.
49. B. Mahalingam, A. Cuesta-Munoz, E.A. Davis, F.M. Matschinsky, R.W. Harrison and I.T. Weber, "Structural model of human glucokinase in complex with glucose and ATP: implications for the mutants that cause hypo- and hyperglycemia", *Diabetes* 48(1999) 1698-1705.

50. V.V. Heredia, J. Thomson, D. Nettleton and S. Sun, "Glucose-induced conformational changes in glucokinase mediate allosteric regulation: transient kinetic analysis", *Biochemistry* 45(2006) 7553-7562.
51. C.M. Anderson, R.E. Stenkamp, R.C. McDonald and T.A. Steitz, "A refined model of the sugar binding site of yeast hexokinase B", *J Mol Biol* 123(1978) 207-219.
52. A.E. Aleshin, C. Kirby, X. Liu, G.P. Bourenkov, H.D. Bartunik, H.J. Fromm and R.B. Honzatko, "Crystal structures of mutant monomeric hexokinase I reveal multiple ADP binding sites and conformational changes relevant to allosteric regulation", *J Mol Biol* 296(2000) 1001-1015.
53. P. Bork, C. Sander and A. Valencia, "An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins", *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1992) 7290-7294.
54. J. Molnes, K. Teigen, I. Aukrust, L. Bjorkhaug, O. Sovik, T. Flatmark and P.R. Njolstad, "Binding of ATP at the active site of human pancreatic glucokinase--nucleotide-induced conformational changes with possible implications for its kinetic cooperativity", *FEBS J* 278(2011) 2372-2386.
55. M.A. Magnuson and K.D. Shelton, "An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell", *J Biol Chem* 264(1989) 15936-15942.
56. M. Stoffel, P. Froguel, J. Takeda, H. Zouali, N. Vionnet, S. Nishi, I.T. Weber, R.W. Harrison, S.J. Pilgis, S. Lesage and et al., "Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus", *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1992) 7698-7702.
57. P.B. Iynedjian, P.R. Pilot, T. Nospikel, J.L. Milburn, C. Quaade, S. Hughes, C. Ucla and C.B. Newgard, "Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans", *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(1989) 7838-7842.
58. Y. Liang, T.L. Jetton, E.C. Zimmerman, H. Najafi, F.M. Matschinsky and M.A. Magnuson, "Effects of alternate RNA splicing on glucokinase isoform activities in the pancreatic islet, liver, and pituitary", *J Biol Chem* 266(1991) 6999-7007.

59. F.M. Matschinsky, "Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics", *Diabetes* 51 Suppl 3(2002) S394-404.
60. P.B. Iynedjian, C. Ucla and B. Mach, "Molecular cloning of glucokinase cDNA. Developmental and dietary regulation of glucokinase mRNA in rat liver", *J Biol Chem* 262(1987) 6032-6038.
61. P.B. Iynedjian, A. Gjinovci and A.E. Renold, "Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats", *J Biol Chem* 263(1988) 740-744.
62. P.B. Iynedjian, R.A. Roth, M. Fleischmann and A. Gjinovci, "Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase", *Biochem J* 351 Pt 3(2000) 621-627.
63. M. Foretz, C. Pacot, I. Dugail, P. Lemarchand, C. Guichard, X. Le Liepvre, C. Berthelie-Lubrano, B. Spiegelman, J.B. Kim, P. Ferre and F. Foufelle, "ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose", *Mol Cell Biol* 19(1999) 3760-3768.
64. C. Postic, J.F. Decaux and J. Girard, "Regulation of hepatic glucokinase gene expression", In Magnusom M, Matschinsky F, editors. *Glucokinase and glycemic diseases: from basics to novel therapeutics: Basel: Karger.*(2004) p.180-192.
65. U. Roth, K. Curth, T.G. Unterman and T. Kietzmann, "The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway", *J Biol Chem* 279(2004) 2623-2631.
66. C. Fernandez-Mejia and M.S. German, "Regulation of glucokinase by vitamins and hormones.", In Magnusom M, Matschinsky F, editors. *Glucokinase and glycemic diseases: from basics to novel therapeutics: Basel: Karger.*(2004) p.240-248.
67. F.J. Bedoya, F.M. Matschinsky, T. Shimizu, J.J. O'Neil and M.C. Appel, "Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of the rat", *J Biol Chem* 261(1986) 10760-10764.

68. W.J. Malaisse, A. Sener and J. Levy, "Fasting decreases the stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release. Fasting induced adaptation of key glucolytic", *J Biol Chem*(1976) 1731-1737.
69. Y. Liang, H. Najafi and F.M. Matschinsky, "Glucose regulates glucokinase activity in cultured islets from rat pancreas", *J Biol Chem* 265(1990) 16863-16866.
70. B. Leibiger, P.-O. Berggren and I. Leibiger, "Regulation of beta-cell GK gene transcription by insulin.", In Magnusom M, Matschinsky F, editors. *Glucokinase and glycemic diseases: from basics to novel therapeutics: Basel: Karger*. 16(2004) p.249-261.
71. B. Leibiger, I.B. Leibiger, T. Moede, S. Kemper, R.N. Kulkarni, C.R. Kahn, L.M. de Vargas and P.O. Berggren, "Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells", *Mol Cell* 7(2001) 559-570.
72. G. da Silva Xavier, A. Varadi, E.K. Ainscow and G.A. Rutter, "Regulation of gene expression by glucose in pancreatic beta -cells (MIN6) via insulin secretion and activation of phosphatidylinositol 3'-kinase", *J Biol Chem* 275(2000) 36269-36277.
73. D. Zelent, H. Najafi, S. Odili, C. Buettger, H. Weik-Collins, C. Li, N. Doliba, J. Grimsby and F.M. Matschinsky, "Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas", *Biochem Soc Trans* 33(2005) 306-310.
74. P. Ekman and E. Nilsson, "Phosphorylation of glucokinase from rat liver in vitro by protein kinase A with a concomitant decrease of its activity", *Arch Biochem Biophys* 261(1988) 275-282.
75. M.J. Munoz-Alonso, G. Guillemain, N. Kassis, J. Girard, A.F. Burnol and A. Leturque, "A novel cytosolic dual specificity phosphatase, interacting with glucokinase, increases glucose phosphorylation rate", *J Biol Chem* 275(2000) 32406-32412.
76. B.E. Kemp and R.B. Pearson, "Protein kinase recognition sequence motifs", *Trends Biochem Sci* 15(1990) 342-346.
77. K. Heidrich, A. Otto, J. Behlke, J. Rush, K.W. Wenzel and T. Kriegel, "Autophosphorylation-inactivation site of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*", *Biochemistry* 36(1997) 1960-1964.

78. R. Golbik, M. Naumann, A. Otto, E. Muller, J. Behlke, R. Reuter, G. Hubner and T.M. Kriegel, "Regulation of phosphotransferase activity of hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by modification at serine-14", *Biochemistry* 40(2001) 1083-1090.
79. P.S. Tippet and K.E. Neet, "Interconversions between different sulfhydryl-related kinetic states in glucokinase", *Arch Biochem Biophys* 222(1983) 285-298.
80. M. Tiedge, S. Baltrusch and S. Lenzen, "Role of sulfhydryl groups in GK catalysis for GK function.", In Magnusom M, Matschinsky F, editors. *Glucokinase and glycemic diseases: from basics to novel therapeutics*: Basel: Karger. 16(2004) p.275-288.
81. M.A. Rizzo and D.W. Piston, "Regulation of beta cell glucokinase by S-nitrosylation and association with nitric oxide synthase", *J Cell Biol* 161(2003) 243-248.
82. P.S. Tippet and K.E. Neet, "Specific inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A below the critical micelle concentration", *J Biol Chem*(1982) 12839:12845.
83. P.S. Tippet and K.E. Neet, "An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A", *J Biol Chem*(1982) 12846:12852.
84. A. Vandercammen and E. Van Schaftingen, "Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein", *Eur J Biochem* 200(1991) 545-551.
85. L. Hue, L. Maisin and M.H. Rider, "Palmitate inhibits liver glycolysis. Involvement of fructose 2,6-bisphosphate in the glucose/fatty acid cycle", *Biochem J* 251(1988) 541-545.
86. P.A. Wals and J. Katz, "Glucose-glucose 6-phosphate cycling in hepatocytes determined by incorporation of 3HOH and D2O. Effect of glycosyns and fructose", *J Biol Chem* 269(1994) 18343-18352.
87. L. Massa, S. Baltrusch, D.A. Okar, A.J. Lange, S. Lenzen and M. Tiedge, "Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells", *Diabetes* 53(2004) 1020-1029.

88. N.N. Danial, C.F. Gramm, L. Scorrano, C.Y. Zhang, S. Krauss, A.M. Ranger, S.R. Datta, M.E. Greenberg, L.J. Licklider, B.B. Lowell, S.P. Gygi and S.J. Korsmeyer, "BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis", *Nature* 424(2003) 952-956.
89. A. Shiraishi, Y. Yamada, Y. Tsuura, S. Fijimoto, K. Tsukiyama, E. Mukai, Y. Toyoda, I. Miwa and Y. Seino, "A novel glucokinase regulator in pancreatic beta cells: precursor of propionyl-CoA carboxylase beta subunit interacts with glucokinase and augments its activity", *J Biol Chem* 276(2001) 2325-2328.
90. L. Bjorkhaug, J. Molnes, O. Sovik, P.R. Njolstad and T. Flatmark, "Allosteric activation of human glucokinase by free polyubiquitin chains and its ubiquitin-dependent cotranslational proteasomal degradation", *J Biol Chem* 282(2007) 22757-22764.
91. S.K. Das, W.S. Chu, T.C. Hale, X. Wang, R.L. Craig, H. Wang, A.R. Shuldiner, P. Froguel, P. Deloukas, M.I. McCarthy, E. Zeggini, S.J. Hasstedt and S.C. Elbein, "Polymorphisms in the glucokinase-associated, dual-specificity phosphatase 12 (DUSP12) gene under chromosome 1q21 linkage peak are associated with type 2 diabetes", *Diabetes* 55(2006) 2631-2639.
92. J.P. Kraus, F. Kalousek and L.E. Rosenberg, "Biosynthesis and mitochondrial processing of the beta subunit of propionyl coenzyme A carboxylase from rat liver", *J Biol Chem* 258(1983) 7245-7248.
93. Y. Toyoda, S. Yoshie, H. Shironoguchi and I. Miwa, "Glucokinase is concentrated in insulin-secreatory granules of pancreatic B-cells", *Histochem Cell Biol* 112(1999) 35-40.
94. M. Stubbs, S. Aiston and L. Agius, "Subcellular localization, mobility, and kinetic activity of glucokinase in glucose-responsive insulin-secreting cells", *Diabetes* 49(2000) 2048-2055.
95. M.A. Rizzo, M.A. Magnuson, P.F. Drain and D.W. Piston, "A functional link between glucokinase binding to insulin granules and conformational alterations in response to glucose and insulin", *J Biol Chem* 277(2002) 34168-34175.
96. A.D. Lajoix, H. Reggio, T. Chardes, S. Peraldi-Roux, F. Tribillac, M. Roye, S. Dietz, C. Broca, M. Manteghetti, G. Ribes, C.B. Wollheim and R. Gross, "A neuronal isoform of

- nitric oxide synthase expressed in pancreatic beta-cells controls insulin secretion", *Diabetes* 50(2001) 1311-1323.
97. S.Y. Ding, N.D. Tribble, C.A. Kraft, M. Markwardt, A.L. Gloyn and M.A. Rizzo, "Naturally occurring glucokinase mutations are associated with defects in posttranslational S-nitrosylation", *Mol Endocrinol* 24(2010) 171-177.
 98. D.R. Green and G. Kroemer, "The pathophysiology of mitochondrial cell death", *Science* 305(2004) 626-629.
 99. D.R. Plas and C.B. Thompson, "Cell metabolism in the regulation of programmed cell death", *Trends Endocrinol Metab* 13(2002) 75-78.
 100. N.N. Danial, L.D. Walensky, C.Y. Zhang, C.S. Choi, J.K. Fisher, A.J. Molina, S.R. Datta, K.L. Pitter, G.H. Bird, J.D. Wikstrom, J.T. Deeney, K. Robertson, J. Morash, A. Kulkarni, S. Neschen, S. Kim, M.E. Greenberg, B.E. Corkey, O.S. Shirihai, G.I. Shulman, B.B. Lowell and S.J. Korsmeyer, "Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival", *Nat Med* 14(2008) 144-153.
 101. N.N. Danial, "BAD: undertaker by night, candyman by day", *Oncogene* 27 Suppl 1(2008) S53-70.
 102. S. Baltrusch, S. Lenzen, D.A. Okar, A.J. Lange and M. Tiedge, "Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner", *J Biol Chem* 276(2001) 43915-43923.
 103. T.H. Claus, M.R. El-Maghrabi, D.M. Regen, H.B. Stewart, M. McGrane, P.D. Kountz, F. Nyfeler, J. Pilkis and S.J. Pilkis, "The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism", *Curr Top Cell Regul* 23(1984) 57-86.
 104. D.A. Okar, A. Manzano, A. Navarro-Sabate, L. Riera, R. Bartrons and A.J. Lange, "PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate", *Trends Biochem Sci* 26(2001) 30-35.
 105. S.J. Pilkis, T.H. Claus, I.J. Kurland and A.J. Lange, "6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme", *Annu Rev Biochem* 64(1995) 799-835.

106. I.J. Kurland and S.J. Pilkis, "Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme", *Protein Sci* 4(1995) 1023-1037.
107. J.L. Rosa, F. Ventura, A. Tauler and R. Bartrons, "Regulation of hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene expression by glucagon", *J Biol Chem* 268(1993) 22540-22545.
108. W.E. Smith, S. Langer, C. Wu, S. Baltrusch and D.A. Okar, "Molecular coordination of hepatic glucose metabolism by the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase:glucokinase complex", *Mol Endocrinol* 21(2007) 1478-1487.
109. S. Langer, M.T. Kaminski, S. Lenzen and S. Baltrusch, "Endogenous activation of glucokinase by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase is glucose dependent", *Mol Endocrinol* 24(2010) 1988-1997.
110. V.A. Payne, C. Arden, C. Wu, A.J. Lange and L. Agius, "Dual role of phosphofructokinase-2/fructose bisphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes", *Diabetes* 54(2005) 1949-1957.
111. V.A. Payne, C. Arden, A.J. Lange and L. Agius, "Contributions of glucokinase and phosphofructokinase-2/fructose bisphosphatase-2 to the elevated glycolysis in hepatocytes from Zucker fa/fa rats", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(2007) R618-625.
112. D.A. Okar, A.J. Lange and C. Wu, "Interaction with PFK-/FBP-2 is essential to glucokinase molecular physiology", *Cell Mol Life Sci* 66(2009) 731-732.
113. F. Watanabe and E. Furuya, "Quantitative image analysis reveals that phosphorylation of liver-type isozyme of fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase does not affect nuclear translocation of glucokinase in rat primary hepatocytes", *J Biochem* 148(2010) 713-719.
114. N. de la Iglesia, M. Veiga-da-Cunha, E. Van Schaftingen, J.J. Guinovart and J.C. Ferrer, "Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase", *FEBS Lett* 456(1999) 332-338.

115. C. Shiota, J. Coffey, J. Grimsby, J.F. Grippo and M.A. Magnuson, "Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase", *J Biol Chem* 274(1999) 37125-37130.
116. F. Bontemps, L. Hue and H.G. Hers, "Phosphorylation of glucose in isolated rat hepatocytes. Sigmoidal kinetics explained by the activity of glucokinase alone", *Biochem J* 174(1978) 603-611.
117. D.G. Clark, O.H. Filsell and D.L. Topping, "Effects of fructose concentration on carbohydrate metabolism, heat production and substrate cycling in isolated rat hepatocytes.", *Biochem J*(1979) 501-507.
118. A. Vandercammen, M. Detheux and E. Van Schaftingen, "Binding of sorbitol 6-phosphate and of fructose 1-phosphate to the regulatory protein of liver glucokinase", *Biochem J* 286 (Pt 1)(1992) 253-256.
119. M. Veiga-da-Cunha and E. Van Schaftingen, "Identification of fructose 6-phosphate- and fructose 1-phosphate-binding residues in the regulatory protein of glucokinase", *J Biol Chem* 277(2002) 8466-8473.
120. E. Van Schaftingen, M. Detheux and M. Veiga da Cunha, "Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein", *FASEB J* 8(1994) 414-419.
121. S. Aiston, K.Y. Trinh, A.J. Lange, C.B. Newgard and L. Agius, "Glucose-6-phosphatase overexpression lowers glucose 6-phosphate and inhibits glycogen synthesis and glycolysis in hepatocytes without affecting glucokinase translocation. Evidence against feedback inhibition of glucokinase", *J Biol Chem* 274(1999) 24559-24566.
122. L. Harndahl, D. Schmoll, A.W. Herling and L. Agius, "The role of glucose 6-phosphate in mediating the effects of glucokinase overexpression on hepatic glucose metabolism", *FEBS J* 273(2006) 336-346.
123. E. Alvarez, I. Roncero, J.A. Chowen, P. Vazquez and E. Blazquez, "Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain", *J Neurochem* 80(2002) 45-53.

124. I. Roncero, C. Sanz, E. Alvarez, P. Vazquez, P.A. Barrio and E. Blazquez, "Glucokinase and glucokinase regulatory proteins are functionally coexpressed before birth in the rat brain", *J Neuroendocrinol* 21(2009) 973-981.
125. J. Grimsby, J.W. Coffey, M.T. Dvorožniak, J. Magram, G. Li, F.M. Matschinsky, C. Shiota, S. Kaur, M.A. Magnuson and J.F. Grippo, "Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice", *J Biol Chem* 275(2000) 7826-7831.
126. R.R. Zawulich WS, Pagliara AS, Matschinsky FM, "A comparison of the utilization rates and hormone-releasing actions of glucose, mannose and fructose in isolated pancreatic islets", *J Biol Chem* 252(1977) 8519-8523.
127. W.J. Malaisse, F. Malaisse-Lagae, D.R. Davies, A. Vandercammen and E. Van Schaftingen, "Regulation of glucokinase by a fructose-1-phosphate-sensitive protein in pancreatic islets", *Eur J Biochem* 190(1990) 539-545.
128. N.L. Beer, N.D. Tribble, L.J. McCulloch, C. Roos, P.R. Johnson, M. Orho-Melander and A.L. Gloyn, "The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver", *Hum Mol Genet* 18(2009) 4081-4088.
129. K.S. Brown, S.S. Kalinowski, J.R. Megill, S.K. Durham and K.A. Mookhtiar, "Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus", *Diabetes* 46(1997) 179-186.
130. Y. Toyoda, I. Miwa, S. Satake, M. Anai and Y. Oka, "Nuclear location of the regulatory protein of glucokinase in rat liver and translocation of the regulator to the cytoplasm in response to high glucose", *Biochem Biophys Res Commun* 215(1995) 467-473.
131. D. Farrelly, K.S. Brown, A. Tieman, J. Ren, S.A. Lira, D. Hagan, R. Gregg, K.A. Mookhtiar and N. Hariharan, "Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation", *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1999) 14511-14516.
132. T.L. Jetton, M. Shiota, S.M. Knobel, D.W. Piston, A.D. Cherrington and M.A. Magnuson, "Substrate-induced nuclear export and peripheral compartmentalization

- of hepatic glucokinase correlates with glycogen deposition", *Int J Exp Diabetes Res* 2(2001) 173-186.
133. S. Baltrusch, F. Francini, S. Lenzen and M. Tiedge, "Interaction of glucokinase with the liver regulatory protein is conferred by leucine-asparagine motifs of the enzyme", *Diabetes* 54(2005) 2829-2837.
134. K.S. Cullen, F.M. Matschinsky, L. Agius and C. Arden, "Susceptibility of glucokinase-MODY mutants to inactivation by oxidative stress in pancreatic beta-cells", *Diabetes* 60(2011) 3175-3185.
135. N. Vionnet, M. Stoffel, J. Takeda, K. Yasuda, G.I. Bell, H. Zouali, S. Lesage, G. Velho, F. Iris, P. Passa and et al., "Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus", *Nature* 356(1992) 721-722.
136. A. Grupe, B. Hultgren, A. Ryan, Y.H. Ma, M. Bauer and T.A. Stewart, "Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis", *Cell* 83(1995) 69-78.
137. C. Postic, M. Shiota, K.D. Niswender, T.L. Jetton, Y. Chen, J.M. Moates, K.D. Shelton, J. Lindner, A.D. Cherrington and M.A. Magnuson, "Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase", *J Biol Chem* 274(1999) 305-315.
138. D. Bali, A. Svetlanov, H.W. Lee, D. Fusco-DeMane, M. Leiser, B. Li, N. Barzilai, M. Surana, H. Hou, N. Fleischer and et al., "Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene", *J Biol Chem* 270(1995) 21464-21467.
139. K.D. Niswender, C. Postic, T.L. Jetton, B.D. Bennett, D.W. Piston, S. Efrat and M.A. Magnuson, "Cell-specific expression and regulation of a glucokinase gene locus transgene", *J Biol Chem* 272(1997) 22564-22569.
140. P.B. Iynedjian, "Molecular physiology of mammalian glucokinase", *Cell Mol Life Sci* 66(2009) 27-42.
141. M. Shiota, C. Postic, Y. Fujimoto, T.L. Jetton, K. Dixon, D. Pan, J. Grimsby, J.F. Grippo, M.A. Magnuson and A.D. Cherrington, "Glucokinase gene locus transgenic

- mice are resistant to the development of obesity-induced type 2 diabetes", *Diabetes* 50(2001) 622-629.
142. A.D. Cherrington, "Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo", *Diabetes* 48(1999) 1198-1214.
143. T.F. Williams, J.H. Exton, C.R. Park and D.M. Regen, "Stereospecific transport of glucose in the perfused rat liver", *Am J Physiol* 215(1968) 1200-1209.
144. J.C. Ferrer, C. Favre, R.R. Gomis, J.M. Fernandez-Novell, M. Garcia-Rocha, N. de la Iglesia, E. Cid and J.J. Guinovart, "Control of glycogen deposition", *FEBS Lett* 546(2003) 127-132.
145. S. Aiston, B. Andersen and L. Agius, "Glucose 6-phosphate regulates hepatic glycogenolysis through inactivation of phosphorylase", *Diabetes* 52(2003) 1333-1339.
146. H. Takeuchi, Y. Inoue, H. Ishihara and Y. Oka, "Overexpression of either liver type or pancreatic beta cell type glucokinase via recombinant adenovirus enhances glucose oxidation in isolated rat hepatocytes", *FEBS Lett* 393(1996) 60-64.
147. J. Seoane, A. Barbera, S. Telemaque-Potts, C.B. Newgard and J.J. Guinovart, "Glucokinase overexpression restores glucose utilization and storage in cultured hepatocytes from male Zucker diabetic fatty rats", *J Biol Chem* 274(1999) 31833-31838.
148. T. Ferre, A. Pujol, E. Riu, F. Bosch and A. Valera, "Correction of diabetic alterations by glucokinase", *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1996) 7225-7230.
149. N. Hariharan, D. Farrelly, D. Hagan, D. Hillyer, C. Arbeeny, T. Sabrah, A. Treloar, K. Brown, S. Kalinowski and K. Mookhtiar, "Expression of human hepatic glucokinase in transgenic mice liver results in decreased glucose levels and reduced body weight", *Diabetes* 46(1997) 11-16.
150. R.M. O'Doherty, D.L. Lehman, S. Telemaque-Potts and C.B. Newgard, "Metabolic impact of glucokinase overexpression in liver: lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia", *Diabetes* 48(1999) 2022-2027.

151. U.J. Desai, E.D. Slosberg, B.R. Boettcher, S.L. Caplan, B. Fanelli, Z. Stephan, V.J. Gunther, M. Kaleko and S. Connelly, "Phenotypic correction of diabetic mice by adenovirus-mediated glucokinase expression", *Diabetes* 50(2001) 2287-2295.
152. R.R. Whitesell, A.C. Powers, D.M. Regen and N.A. Abumrad, "Transport and metabolism of glucose in an insulin-secreting cell line, beta TC-1", *Biochemistry* 30(1991) 11560-11566.
153. M. Tal, Y. Liang, H. Najafi, H.F. Lodish and F.M. Matschinsky, "Expression and function of GLUT-1 and GLUT-2 glucose transporter isoforms in cells of cultured rat pancreatic islets", *J Biol Chem* 267(1992) 17241-17247.
154. F. Schuit, K. Moens, H. Heimberg and D. Pipeleers, "Cellular origin of hexokinase in pancreatic islets", *J Biol Chem* 274(1999) 32803-32809.
155. F.M. Matschinsky, "Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy", *Nat Rev Drug Discov* 8(2009) 399-416.
156. Y. Terauchi, H. Sakura, K. Yasuda, K. Iwamoto, N. Takahashi, K. Ito, H. Kasai, H. Suzuki, O. Ueda, N. Kamada and et al., "Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose", *J Biol Chem* 270(1995) 30253-30256.
157. S. Porat, N. Weinberg-Corem, S. Tornovsky-Babaey, R. Schyr-Ben-Haroush, A. Hija, M. Stolovich-Rain, D. Dadon, Z. Granot, V. Ben-Hur, P. White, C.A. Girard, R. Karni, K.H. Kaestner, F.M. Ashcroft, M.A. Magnuson, A. Saada, J. Grimsby, B. Glaser and Y. Dor, "Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism", *Cell Metab* 13(2011) 440-449.
158. S.S. Fajans, G.I. Bell and K.S. Polonsky, "Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young", *N Engl J Med* 345(2001) 971-980.
159. B.E. Levin, V.H. Routh, L. Kang, N.M. Sanders and A.A. Dunn-Meynell, "Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years?", *Diabetes* 53(2004) 2521-2528.
160. M. Navarro, F. Rodriguez de Fonseca, E. Alvarez, J.A. Chowen, J.A. Zueco, R. Gomez, J. Eng and E. Blazquez, "Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors,

- glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake", *J Neurochem* 67(1996) 1982-1991.
161. J. Gromada, I. Franklin and C.B. Wollheim, "Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains", *Endocr Rev* 28(2007) 84-116.
 162. Y.J. Liu, E. Vieira and E. Gylfe, "A store-operated mechanism determines the activity of the electrically excitable glucagon-secreting pancreatic alpha-cell", *Cell Calcium* 35(2004) 357-365.
 163. E. Vieira, A. Salehi and E. Gylfe, "Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells", *Diabetologia* 50(2007) 370-379.
 164. A.S. Pagliara, S.N. Stillings, W.S. Zawulich, A.D. Williams and F.M. Matchinsky, "Glucose and 3-O-methylglucose protection against alloxan poisoning of pancreatic alpha and beta cells", *Diabetes* 26(1977) 973-979.
 165. F.M. Matschinsky, C. Rujanavech, A. Pagliara and W.T. Norfleet, "Adaptations of alpha2- and beta-cells of rat and mouse pancreatic islets to starvation, to refeeding after starvation, and to obesity", *J Clin Invest* 65(1980) 207-218.
 166. D. Zelent, M.L. Golson, B. Koeberlein, R. Quintens, L. van Lommel, C. Buettger, H. Weik-Collins, R. Taub, J. Grimsby, F. Schuit, K.H. Kaestner and F.M. Matschinsky, "A glucose sensor role for glucokinase in anterior pituitary cells", *Diabetes* 55(2006) 1923-1929.
 167. R.L. Sorenson, L.E. Stout, T.C. Brelje, T.L. Jetton and F.M. Matschinsky, "Immunohistochemical evidence for the presence of glucokinase in the gonadotropes and thyrotropes of the anterior pituitary gland of rat and monkey", *J Histochem Cytochem* 55(2007) 555-566.
 168. M.J. Dunne, K.E. Cosgrove, R.M. Shepherd, A. Aynsley-Green and K.J. Lindley, "Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease", *Physiol Rev* 84(2004) 239-275.

-
169. P. Thomas, Y. Ye and E. Lightner, "Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy", *Hum Mol Genet* 5(1996) 1809-1812.
170. P.M. Thomas, G.J. Cote, N. Wohllk, B. Haddad, P.M. Mathew, W. Rabl, L. Aguilar-Bryan, R.F. Gagel and J. Bryan, "Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy", *Science* 268(1995) 426-429.
171. C.A. Stanley, Y.K. Lieu, B.Y. Hsu, A.B. Burlina, C.R. Greenberg, N.J. Hopwood, K. Perlman, B.H. Rich, E. Zammarchi and M. Poncz, "Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene", *N Engl J Med* 338(1998) 1352-1357.
172. P.T. Clayton, S. Eaton, A. Aynsley-Green, M. Edginton, K. Hussain, S. Krywawych, V. Datta, H.E. Malingre, R. Berger and I.E. van den Berg, "Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion", *J Clin Invest* 108(2001) 457-465.
173. K. Hojlund, T. Hansen, M. Lajer, J.E. Henriksen, K. Levin, J. Lindholm, O. Pedersen and H. Beck-Nielsen, "A novel syndrome of autosomal-dominant hyperinsulinemic hypoglycemia linked to a mutation in the human insulin receptor gene", *Diabetes* 53(2004) 1592-1598.
174. E.R. Pearson, S.F. Boj, A.M. Steele, T. Barrett, K. Stals, J.P. Shield, S. Ellard, J. Ferrer and A.T. Hattersley, "Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene", *PLoS Med* 4(2007) e118.
175. T. Otonkoski, H. Jiao, N. Kaminen-Ahola, I. Tapia-Paez, M.S. Ullah, L.E. Parton, F. Schuit, R. Quintens, I. Sipila, E. Mayatepek, T. Meissner, A.P. Halestrap, G.A. Rutter and J. Kere, "Physical exercise-induced hypoglycemia caused by failed silencing of monocarboxylate transporter 1 in pancreatic beta cells", *Am J Hum Genet* 81(2007) 467-474.
176. M.M. Gonzalez-Barroso, I. Giurgea, F. Bouillaud, A. Anedda, C. Bellanne-Chantelot, L. Hubert, Y. de Keyzer, P. de Lonlay and D. Ricquier, "Mutations in UCP2 in

- congenital hyperinsulinism reveal a role for regulation of insulin secretion", *PLoS One* 3(2008) e3850.
177. S.E. Flanagan, R.R. Kapoor and K. Hussain, "Genetics of congenital hyperinsulinemic hypoglycemia", *Semin Pediatr Surg* 20(2011) 13-17.
 178. P. Huypens, Z. Ling, D. Pipeleers and F. Schuit, "Glucagon receptors on human islet cells contribute to glucose competence of insulin release", *Diabetologia* 43(2000) 1012-1019.
 179. U. Panten, J. Burgfeld, F. Goerke, M. Rennie, M. Schwanstecher, A. Wallasch, B.J. Zunkler and S. Lenzen, "Control of insulin secretion by sulfonylureas, meglitinide and diazoxide in relation to their binding to the sulfonylurea receptor in pancreatic islets", *Biochem Pharmacol* 38(1989) 1217-1229.
 180. P. de Lonlay-Debeney, F. Poggi-Travert, J.C. Fournet, C. Sempoux, C.D. Vici, F. Brunelle, G. Touati, J. Rahier, C. Junien, C. Nihoul-Fekete, J.J. Robert and J.M. Saudubray, "Clinical features of 52 neonates with hyperinsulinism", *N Engl J Med* 340(1999) 1169-1175.
 181. H.B. Christesen, N.D. Tribble, A. Molven, J. Siddiqui, T. Sandal, K. Brusgaard, S. Ellard, P.R. Njolstad, J. Alm, B. Brock Jacobsen, K. Hussain and A.L. Gloyn, "Activating glucokinase (GCK) mutations as a cause of medically responsive congenital hyperinsulinism: prevalence in children and characterisation of a novel GCK mutation", *Eur J Endocrinol* 159(2008) 27-34.
 182. A.L. Gloyn, K. Noordam, M.A. Willemsen, S. Ellard, W.W. Lam, I.W. Campbell, P. Midgley, C. Shiota, C. Buettger, M.A. Magnuson, F.M. Matschinsky and A.T. Hattersley, "Insights into the biochemical and genetic basis of glucokinase activation from naturally occurring hypoglycemia mutations", *Diabetes* 52(2003) 2433-2440.
 183. L.G. Wabitsch M, Van de Bunt M, Marchant C, Lindner M, von Puttkamer J, Fenneberg A, Debatin KM, Klein R, Ellard S, Clark A, Gloyn AL., "Heterogeneity in disease severity in a family with a novel G68V GCK activating mutation causing persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy.", *Diabet Med.* 24(12)(2007) 1393-1399.

184. S. Kassem, S. Bhandari, P. Rodriguez-Bada, R. Motaghedi, M. Heyman, M.A. Garcia-Gimeno, N. Cobo-Vuilleumier, P. Sanz, N.K. Maclaren, J. Rahier, B. Glaser and A.L. Cuesta-Munoz, "Large islets, beta-cell proliferation, and a glucokinase mutation", *N Engl J Med* 362(2010) 1348-1350.
185. S. Sayed, D.R. Langdon, S. Odili, P. Chen, C. Buettger, A.B. Schiffman, M. Suchi, R. Taub, J. Grimsby, F.M. Matschinsky and C.A. Stanley, "Extremes of clinical and enzymatic phenotypes in children with hyperinsulinism caused by glucokinase activating mutations", *Diabetes* 58(2009) 1419-1427.
186. N.L. Beer, M. van de Bunt, K. Colclough, C. Lukacs, P. Arundel, C.L. Chik, J. Grimsby, S. Ellard and A.L. Gloyn, "Discovery of a novel site regulating glucokinase activity following characterization of a new mutation causing hyperinsulinemic hypoglycemia in humans", *J Biol Chem* 286(2011) 19118-19126.
187. A.L. Cuesta-Munoz, H. Huopio, T. Otonkoski, J.M. Gomez-Zumaquero, K. Nanto-Salonen, J. Rahier, S. Lopez-Enriquez, M.A. Garcia-Gimeno, P. Sanz, F.C. Soriguer and M. Laakso, "Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo glucokinase mutation", *Diabetes* 53(2004) 2164-2168.
188. F. Barbetti, N. Cobo-Vuilleumier, C. Dionisi-Vici, S. Toni, P. Ciampalini, O. Massa, P. Rodriguez-Bada, C. Colombo, L. Lenzi, M.A. Garcia-Gimeno, F.J. Bermudez-Silva, F. Rodriguez de Fonseca, P. Banin, J.C. Aledo, E. Baixeras, P. Sanz and A.L. Cuesta-Munoz, "Opposite clinical phenotypes of glucokinase disease: Description of a novel activating mutation and contiguous inactivating mutations in human glucokinase (GCK) gene", *Mol Endocrinol* 23(2009) 1983-1989.
189. T. Meissner, J. Marquard, N. Cobo-Vuilleumier, M. Maringa, P. Rodriguez-Bada, M.A. Garcia-Gimeno, E. Baixeras, J. Weber, K. Olek, P. Sanz, E. Mayatepek and A.L. Cuesta-Munoz, "Diagnostic difficulties in glucokinase hyperinsulinism", *Horm Metab Res* 41(2009) 320-326.
190. H.B. Christesen, B.B. Jacobsen, S. Odili, C. Buettger, A. Cuesta-Munoz, T. Hansen, K. Brusgaard, O. Massa, M.A. Magnuson, C. Shiota, F.M. Matschinsky and F. Barbetti, "The second activating glucokinase mutation (A456V): implications for glucose homeostasis and diabetes therapy", *Diabetes* 51(2002) 1240-1246.

191. E.L. Edghill, R.J. Dix, S.E. Flanagan, P.J. Bingley, A.T. Hattersley, S. Ellard and K.M. Gillespie, "HLA genotyping supports a nonautoimmune etiology in patients diagnosed with diabetes under the age of 6 months", *Diabetes* 55(2006) 1895-1898.
192. P.R. Njolstad, J.V. Sagen, L. Bjorkhaug, S. Odili, N. Shehadeh, D. Bakry, S.U. Sarici, F. Alpay, J. Molnes, A. Molven, O. Sovik and F.M. Matschinsky, "Permanent neonatal diabetes caused by glucokinase deficiency: inborn error of the glucose-insulin signaling pathway", *Diabetes* 52(2003) 2854-2860.
193. J.R. Porter, N.J. Shaw, T.G. Barrett, A.T. Hattersley, S. Ellard and A.L. Gloyn, "Permanent neonatal diabetes in an Asian infant", *J Pediatr* 146(2005) 131-133.
194. D. Turkkahraman, I. Bircan, N.D. Tribble, S. Akcurin, S. Ellard and A.L. Gloyn, "Permanent neonatal diabetes mellitus caused by a novel homozygous (T168A) glucokinase (GCK) mutation: initial response to oral sulphonylurea therapy", *J Pediatr* 153(2008) 122-126.
195. O. Rubio-Cabezas, F. Diaz Gonzalez, A. Aragonés, J. Argente and A. Campos-Barros, "Permanent neonatal diabetes caused by a homozygous nonsense mutation in the glucokinase gene", *Pediatr Diabetes* 9(2008) 245-249.
196. K. Bennett, C. James, A. Mutair, H. Al-Shaikh, A. Sinani and K. Hussain, "Four novel cases of permanent neonatal diabetes mellitus caused by homozygous mutations in the glucokinase gene", *Pediatr Diabetes* 12(2011) 192-196.
197. C.M. Garcia-Herrero, M. Galan, O. Vincent, B. Flandez, M. Gargallo, E. Delgado-Alvarez, E. Blazquez and M.A. Navas, "Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity", *Diabetologia* 50(2007) 325-333.
198. A.T. Hattersley, "Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity", *Diabet Med* 15(1998) 15-24.
199. R. Murphy, S. Ellard and A.T. Hattersley, "Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes", *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4(2008) 200-213.

200. M.M. Byrne, J. Sturis, K. Clement, N. Vionnet, M.E. Pueyo, M. Stoffel, J. Takeda, P. Passa, D. Cohen, G.I. Bell and et al., "Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations", *J Clin Invest* 93(1994) 1120-1130.
201. G. Velho, K.F. Petersen, G. Perseghin, J.H. Hwang, D.L. Rothman, M.E. Pueyo, G.W. Cline, P. Froguel and G.I. Shulman, "Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects", *J Clin Invest* 98(1996) 1755-1761.
202. F.M. Matschinsky, "Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes", *Diabetes* 39(1990) 647-652.
203. S. Ellard, F. Beards, L.I. Allen, M. Shepherd, E. Ballantyne, R. Harvey and A.T. Hattersley, "A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria", *Diabetologia* 43(2000) 250-253.
204. A.T. Hattersley, F. Beards, E. Ballantyne, M. Appleton, R. Harvey and S. Ellard, "Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight", *Nat Genet* 19(1998) 268-270.
205. G. Spyer, A.T. Hattersley, J.E. Sykes, R.H. Sturley and K.M. MacLeod, "Influence of maternal and fetal glucokinase mutations in gestational diabetes", *Am J Obstet Gynecol* 185(2001) 240-241.
206. E.A. Davis, A. Cuesta-Munoz, M. Raoul, C. Buettger, I. Sweet, M. Moates, M.A. Magnuson and F.M. Matschinsky, "Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and hyperglycaemia syndromes and their analysis illuminates fundamental quantitative concepts of glucose homeostasis", *Diabetologia* 42(1999) 1175-1186.
207. P. Kesavan, L. Wang, E. Davis, A. Cuesta, I. Sweet, K. Niswender, M.A. Magnuson and F.M. Matschinsky, "Structural instability of mutant beta-cell glucokinase: implications for the molecular pathogenesis of maturity-onset diabetes of the young (type-2)", *Biochem J* 322 (Pt 1)(1997) 57-63.
208. M. Galan, O. Vincent, I. Roncero, S. Azriel, P. Boix-Pallares, E. Delgado-Alvarez, F. Diaz-Cadorniga, E. Blazquez and M.A. Navas, "Effects of novel maturity-onset diabetes of the young (MODY)-associated mutations on glucokinase activity and protein stability", *Biochem J* 393(2006) 389-396.

209. J.V. Sagen, S. Odili, L. Bjorkhaug, D. Zelent, C. Buettger, J. Kwagh, C. Stanley, K. Dahl-Jorgensen, C. de Beaufort, G.I. Bell, Y. Han, J. Grimsby, R. Taub, A. Molven, O. Sovik, P.R. Njolstad and F.M. Matschinsky, "From clinicogenetic studies of maturity-onset diabetes of the young to unraveling complex mechanisms of glucokinase regulation", *Diabetes* 55(2006) 1713-1722.
210. A.L. Gloyn, S. Odili, C. Buettger, P.R. Njolstad, C. Shiota, M.A. Magnuson and F.M. Matschinsky, "Glucokinase and the regulation of blood sugar: a mathematical model predicts the threshold for glucose stimulated insulin release for GCK gene mutations that cause hyper- and hypoglycaemia.", In Magnuson M, Matschinsky F, editors. *Glucokinase and glycemic diseases: from basics to novel therapeutics: Basel: Karger.*(2004) p.92-109.
211. M. Veiga-da-Cunha, L.Z. Xu, Y.H. Lee, D. Marotta, S.J. Pilgis and E. Van Schaftingen, "Effect of mutations on the sensitivity of human beta-cell glucokinase to liver regulatory protein", *Diabetologia* 39(1996) 1173-1179.
212. C. Arden, A. Trainer, N. de la Iglesia, K.T. Scougall, A.L. Gloyn, A.J. Lange, J.A. Shaw, F.M. Matschinsky and L. Agius, "Cell biology assessment of glucokinase mutations V62M and G72R in pancreatic beta-cells: evidence for cellular instability of catalytic activity", *Diabetes* 56(2007) 1773-1782.
213. V.V. Heredia, T.J. Carlson, E. Garcia and S. Sun, "Biochemical basis of glucokinase activation and the regulation by glucokinase regulatory protein in naturally occurring mutations", *J Biol Chem* 281(2006) 40201-40207.
214. M.F. Pino, K.A. Kim, K.D. Shelton, J. Lindner, S. Odili, C. Li, H.W. Collins, M. Shiota, F.M. Matschinsky and M.A. Magnuson, "Glucokinase thermolability and hepatic regulatory protein binding are essential factors for predicting the blood glucose phenotype of missense mutations", *J Biol Chem* 282(2007) 13906-13916.
215. E.C. Ralph, J. Thomson, J. Almaden and S. Sun, "Glucose modulation of glucokinase activation by small molecules", *Biochemistry* 47(2008) 5028-5036.
216. K.J. Brocklehurst, V.A. Payne, R.A. Davies, D. Carroll, H.L. Vertigan, H.J. Wightman, S. Aiston, I.D. Waddell, B. Leighton, M.P. Coghlan and L. Agius, "Stimulation of

- hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators", *Diabetes* 53(2004) 535-541.
217. M. Coghlan and B. Leighton, "Glucokinase activators in diabetes management", *Expert Opin Investig Drugs* 17(2008) 145-167.
218. K.R. Guertin and J. Grimsby, "Small molecule glucokinase activators as glucose lowering agents: a new paradigm for diabetes therapy", *Curr Med Chem* 13(2006) 1839-1843.
219. M. Pal, "Recent advances in glucokinase activators for the treatment of type 2 diabetes", *Drug Discov Today* 14(2009) 784-792.
220. R. Sarabu, S.J. Berthel, R.F. Kester and J.W. Tilley, "Novel glucokinase activators: a patent review (2008 - 2010)", *Expert Opin Ther Pat* 21(2007) 13-33.
221. R. Sarabu and J. Grimsby, "Targeting glucokinase activation for the treatment of type 2 diabetes--a status review", *Curr Opin Drug Discov Devel* 8(2005) 631-637.
222. A. BioPharma, "Glucokinase activator ARRY-403: Phase I Single Ascending Dose Top-Line Results.", [<http://www.arraybiopharma.com/Documents/PDF/Slides.pdf>](2009).
223. R.C. Bonadonna, T. Heise, C. Arbet-Engels, C. Kapitza, A. Avogaro, J. Grimsby, J. Zhi, J.F. Grippo and R. Balena, "Piragliatin (RO4389620), a novel glucokinase activator, lowers plasma glucose both in the postabsorptive state and after a glucose challenge in patients with type 2 diabetes mellitus: a mechanistic study", *J Clin Endocrinol Metab* 95(2010) 5028-5036.
224. S. Zhai, M. Mulligan, J. Grimsby, C. Arbet-Engles, M. Boldrin, R. Balena and J. Zhi, "Phase I assessment of a novel glucose activator RO4389620 in healthy male volunteers", *Diabetologia* 51 (Suppl I)(2008).
225. D. Hanahan, "Techniques for transformation of E. coli in DNA cloning", *DM Glover ed. IRL Press Vol 1*(1985).
226. J. Sambrook and D. Russell, "Molecular cloning. A laboratory manual.", (2001).
227. X. Yang, E.J. Hubbard and M. Carlson, "A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system", *Science* 257(1992) 680-682.

-
228. J.H. Miller, J.H. Shinaberger and P.W. Gardner, "Experience with a new plate type dialyzer", *Proc Clin Dial Transplant Forum* 2(1972) 50-51.
229. Y. Liang, P. Kesavan, L.Q. Wang, K. Niswender, Y. Tanizawa, M.A. Permutt, M.A. Magnuson and F.M. Matschinsky, "Variable effects of maturity-onset-diabetes-of-youth (MODY)-associated glucokinase mutations on substrate interactions and stability of the enzyme", *Biochem J* 309 (Pt 1)(1995) 167-173.
230. S.J. Pilkis, "Glucokinase of rat liver", *Methods Enzymol* 42(1975) 31-39.
231. J. Salas, M. Salas, E. Vinuela and A. Sols, "Glucokinase of Rabbit Liver", *J Biol Chem* 240(1965) 1014-1018.
232. M. Dixon, "The determination of enzyme inhibitor constants", *Biochem J* 55(1953) 170-171.
233. T.G. Burland, "DNASTAR's Lasergene sequence analysis software", *Methods Mol Biol* 132(2000) 71-91.
234. J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins, "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools", *Nucleic Acids Res* 25(1997) 4876-4882.
235. R.A. Sayle and E.J. Milner-White, "RASMOL: biomolecular graphics for all", *Trends Biochem Sci* 20(1995) 374.
236. G. Velho, P. Froguel, A.L. Gloyn and A. Hattersley, "Maturity Onset Diabetes of the Young Type 2", In Magnusom M, Matschinsky F, editors. *Glucokinase and glycemic diseases: from basics to novel therapeutics*: Basel: Karger. 16(2004) p.42-64.
237. I. Estalella, I. Rica, G. Perez de Nanclares, J.R. Bilbao, J.A. Vazquez, J.I. San Pedro, M.A. Busturia and L. Castano, "Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain", *Clin Endocrinol (Oxf)* 67(2007) 538-546.
238. K.L. Thomson, A.L. Gloyn, K. Colclough, M. Batten, L.I. Allen, F. Beards, A.T. Hattersley and S. Ellard, "Identification of 21 novel glucokinase (GCK) mutations in

- UK and European Caucasians with maturity-onset diabetes of the young (MODY)", *Hum Mutat* 22(2003) 417.
239. R. Lorini, C. Klersy, G. d'Annunzio, O. Massa, N. Minuto, D. Iafusco, C. Bellanne-Chantelot, A.P. Frongia, S. Toni, F. Meschi, F. Cerutti and F. Barbetti, "Maturity-onset diabetes of the young in children with incidental hyperglycemia: a multicenter Italian study of 172 families", *Diabetes Care* 32(2009) 1864-1866.
 240. O. Massa, F. Meschi, A. Cuesta-Munoz, A. Caumo, F. Cerutti, S. Toni, V. Cherubini, L. Guazzarotti, N. Sulli, F.M. Matschinsky, R. Lorini, D. Iafusco and F. Barbetti, "High prevalence of glucokinase mutations in Italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity and BMI. Diabetes Study Group of the Italian Society of Paediatric Endocrinology and Diabetes (SIEDP)", *Diabetologia* 44(2001) 898-905.
 241. L. Vits, D. Beckers, M. Craen, C. de Beaufort, E. Vanfleteren, K. Dahan, A. Nollet, G. Vanhaverbeke, S.V. Imschoot, J.P. Bourguignon, V. Beauloye, K. Storm, G. Massa, M. Giri, F. Nobels, J. De Schepper, R. Rooman, A. Van den Bruel, C. Mathieu and W. Wuyts, "Identification of novel and recurrent glucokinase mutations in Belgian and Luxembourg maturity onset diabetes of the young patients", *Clin Genet* 70(2006) 355-359.
 242. M.A. Moukil, M. Veiga-da-Cunha and E. Van Schaftingen, "Study of the regulatory properties of glucokinase by site-directed mutagenesis: conversion of glucokinase to an enzyme with high affinity for glucose", *Diabetes* 49(2000) 195-201.
 243. A.M. Efanov, D.G. Barrett, M.B. Brenner, S.L. Briggs, A. Delaunois, J.D. Durbin, U. Giese, H. Guo, M. Radloff, G.S. Gil, S. Sewing, Y. Wang, A. Weichert, A. Zaliani and J. Gromada, "A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function", *Endocrinology* 146(2005) 3696-3701.
 244. K.S. Ullman, M.A. Powers and D.J. Forbes, "Nuclear export receptors: from importin to exportin", *Cell* 90(1997) 967-970.
 245. M. Fornerod, J. van Deursen, S. van Baal, A. Reynolds, D. Davis, K.G. Murti, J. Fransen and G. Grosveld, "The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic

- subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88", *EMBO J* 16(1997) 807-816.
246. N. Kudo, S. Khochbin, K. Nishi, K. Kitano, M. Yanagida, M. Yoshida and S. Horinouchi, "Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins", *J Biol Chem* 272(1997) 29742-29751.
247. N. Kudo, B. Wolff, T. Sekimoto, E.P. Schreiner, Y. Yoneda, M. Yanagida, S. Horinouchi and M. Yoshida, "Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1", *Exp Cell Res* 242(1998) 540-547.
248. D.E. Marotta, G.R. Anand, T.A. Anderson, S.P. Miller, D.A. Okar, D.G. Levitt and A.J. Lange, "Identification and characterization of the ATP-binding site in human pancreatic glucokinase", *Arch Biochem Biophys* 436(2005) 23-31.
249. M. Stoffel, K.L. Bell, C.L. Blackburn, K.L. Powell, T.S. Seo, J. Takeda, N. Vionnet, K.S. Xiang, M. Gidh-Jain, S.J. Pilakis and et al., "Identification of glucokinase mutations in subjects with gestational diabetes mellitus", *Diabetes* 42(1993) 937-940.
250. M. Gidh-Jain, J. Takeda, L.Z. Xu, A.J. Lange, N. Vionnet, M. Stoffel, P. Froguel, G. Velho, F. Sun, D. Cohen and et al., "Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships", *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(1993) 1932-1936.
251. L. Pedelini, M.A. Garcia-Gimeno, A. Marina, J.M. Gomez-Zumaquero, P. Rodriguez-Bada, S. Lopez-Enriquez, F.C. Soriguer, A.L. Cuesta-Munoz and P. Sanz, "Structure-function analysis of the alpha5 and the alpha13 helices of human glucokinase: description of two novel activating mutations", *Protein Sci* 14(2005) 2080-2086.
252. A.L. Gloyn, S. Odili, D. Zelent, C. Buettger, H.A. Castleden, A.M. Steele, A. Stride, C. Shiota, M.A. Magnuson, R. Lorini, G. d'Annunzio, C.A. Stanley, J. Kwagh, E. van Schaftingen, M. Veiga-da-Cunha, F. Barbetti, P. Dunten, Y. Han, J. Grimsby, R. Taub, S. Ellard, A.T. Hattersley and F.M. Matschinsky, "Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young", *J Biol Chem* 280(2005) 14105-14113.

- 253. L. Gerace, "Nuclear export signals and the fast track to the cytoplasm", *Cell* 82(1995) 341-344.
- 254. W. Wen, J.L. Meinkoth, R.Y. Tsien and S.S. Taylor, "Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus", *Cell* 82(1995) 463-473.
- 255. M. Mukhtar, M. Stubbs and L. Agius, "Evidence for glucose and sorbitol-induced nuclear export of glucokinase regulatory protein in hepatocytes", *FEBS Lett* 462(1999) 453-458.
- 256. M. Mukhtar, "Regulation of intracellular trafficking of glucokinase", *Ph D Thesis. Newcastle University, Newcastle, UK*(2005).
- 257. Y. Toyoda, Y. Ito, S. Yoshie and I. Miwa, "Shuttling of glucokinase between the nucleus and the cytoplasm in primary cultures of rat hepatocytes: possible involvement in the regulation of the glucose metabolism", *Arch Histol Cytol* 60(1997) 307-316.
- 258. T. Guttler and D. Gorlich, "Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective", *EMBO J* 30(2011) 3457-3474.

PUBLICACIONES

Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity

C. M. García-Herrero · M. Galán · O. Vincent ·
B. Flández · M. Gargallo · E. Delgado-Alvarez ·
E. Blázquez · M. A. Navas

Received: 14 July 2006 / Accepted: 21 October 2006 / Published online: 21 December 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract

Aims/hypothesis Glucokinase (GCK) acts as a glucose sensor in the pancreatic beta cell and regulates insulin secretion. In the gene encoding GCK the heterozygous mutations that result in enzyme inactivation cause MODY2. Functional studies of naturally occurring *GCK* mutations associated with hyperglycaemia provide further insight into the biochemical basis of glucose sensor regulation. **Materials and methods** Identification of *GCK* mutations in selected MODY patients was performed by single-strand conformation polymorphism and direct sequencing. The

kinetic parameters and thermal stability of recombinant mutant human GCK were determined, and in pull-down assays the effect of these mutations on the association of GCK with glucokinase (hexokinase 4) regulator (GCKR, also known as glucokinase regulatory protein [GKRP]) and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB1, also known as PFK2) was tested.

Results We identified three novel *GCK* mutations: the insertion of an asparagine residue at position 161 (inserN161) and two missense mutations (M235V and R308W). We also identified a fourth mutation (R397L) reported in a previous work. Functional characterisation of these mutations revealed that insertion of asparagine residue N161 fully inactivates GCK, whereas the M235V and R308W mutations only partially impair enzymatic activity. In contrast, GCK kinetics was almost unaffected by the R397L mutation. Although none of these mutations affected the interaction of GCK with PFKFB1, we found that the R308W mutation caused protein instability and increased the strength of interaction with GCKR.

Conclusions/interpretation Our results show that different MODY2 mutations impair GCK function through different mechanisms such as enzymatic activity, protein stability and increased interaction with GCKR, helping further elucidate the regulation of GCK activity.

C. M. García-Herrero · M. Galán · E. Blázquez · M. A. Navas
Department of Biochemistry and Molecular Biology III,
Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid,
Madrid, Spain

O. Vincent
Institute of Biomedical Research Alberto Sols-CSIC,
Madrid, Spain

B. Flández
Endocrinological Service, University Hospital of Getafe,
Getafe, Spain

M. Gargallo
Endocrinological Service, Virgen de la Torre Hospital,
Madrid, Spain

E. Delgado-Alvarez
Endocrinological Service, Hospital General de Asturias,
Oviedo, Spain

M. A. Navas (✉)
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III,
Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid,
Ciudad Universitaria,
28040 Madrid, Spain
e-mail: manavas@med.ucm.es

Keywords GCKR · GKRP · Glucokinase · Glucokinase mutation · Glucokinase regulatory protein · Glucose sensor · MODY · PFK2 · PFKFB1 · 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase

Abbreviations

BCL2 B-cell leukaemia/lymphoma 2
DUSP12 dual specificity phosphatase 12

F1P	fructose 1-phosphate
F6P	fructose 6-phosphate
GCK	glucokinase
GCKR	glucokinase (hexokinase 4) regulator
GST	glutathione <i>S</i> -transferase
K_{cat}	catalytic constant
K_{m}	Michaelis-Menten constant
nH	Hill coefficient
PFKFB1	rat liver isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase
SSCP	single-strand conformation polymorphism

Introduction

MODY is a heterogeneous group of monogenic forms of diabetes mellitus characterised by autosomal dominant inheritance, an early age of onset and beta cell dysfunction [1]. The heterozygous mutations in the gene encoding glucokinase (GCK) that result in enzyme inactivation are the cause of the MODY2 subtype. MODY2 accounts for approximately 30–60% of MODY families and is characterised by a mild form of hyperglycaemia present from birth [2]. These patients are usually treated with diet alone and rarely develop diabetes-associated complications [3].

The specific MODY2 phenotype results from the impairment of GCK function. GCK plays a role as a beta cell glucose sensor by integrating blood glucose levels and glucose metabolism with insulin secretion [4–6]. This specific function of GCK is based on the particular kinetic characteristics of this enzyme, which include a low affinity for glucose, cooperativity with this substrate, and a lack of end-product inhibition at physiological concentrations. In addition, GCK activity is regulated through protein-protein interactions by the glucokinase (hexokinase 4) regulator (GCKR, also known as glucokinase regulatory protein [GKRP]), which acts as a competitive inhibitor with respect to glucose and also regulates the nucleo-cytoplasmic localisation of the enzyme [7–9]. In addition, GCK has been shown to associate with other partners, such as the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB1, also known as PFK2) [10, 11], a dual specificity phosphatase [12], the neuronal isoform of nitric oxide synthase [13], the proapoptotic B-cell leukaemia/lymphoma 2 (BCL2) family member BCL2-antagonist of cell death (BAD) [14] and the precursor of the propionyl-CoA carboxylase beta subunit [15]. Nevertheless, the biological significance of some of these interactions remains to be elucidated.

MODY2 mutations are located throughout the gene and most of them have negative effects on the kinetic

parameters of the enzyme. These effects, which are reflected as a lower activity index, lead to an increased threshold for glucose-stimulated insulin release [16]. However, not all the *GCK* mutations found in MODY families affect the enzymatic activity of GCK equally. Functional characterisation of about one-fourth of MODY2 mutations has shown that the molecular defects of the mutant enzyme are reflected by a modification of one or more kinetic parameters or none of them at all. These results suggest that some of these mutations affect GCK activity through other mechanisms. For example, the involvement of some of these mutations in diabetes has been proposed to be due to an effect on protein stability and/or a loss of regulation by GCKR [17–19]. However, the effects of MODY2 mutations on the interaction of GCK with other cellular partners have not been studied previously.

In this work, we report the identification and characterisation of *GCK* mutations that co-segregate with diabetes in MODY2 families. These mutations include three novel ones: the insertion of an asparagine residue at position 161 (insN161) and two missense mutations, R308W and M235V; we also report a fourth missense mutation, R397L, which has been reported previously [20]. Functional analysis of these mutations was carried out by measuring their effects on the kinetic parameters of the enzyme, on protein stability, and on the interaction of GCK with the associated proteins GCKR, PFKFB1 and dual specificity phosphatase 12 (DUSP12).

Subjects and methods

Subjects The diabetic patients involved in this study were referred to our laboratory for a molecular diagnosis of MODY. The probands were referred by authors of this study, as follows: probands from families P33 and P38 by B. Flández; the proband from family P35 by M. Gargallo; and the proband from family P42 by E. Delgado-Alvarez. The clinical diagnosis of MODY was made using classical criteria: impaired fasting glucose or development of diabetes before the age of 35 years; a negative search for the markers of type 1 diabetes (islet cell antibodies, GAD antibodies, tyrosine phosphatase antibodies, insulin auto-antibodies); and a family history of diabetes for at least two consecutive generations. The HOMA value was calculated as (baseline insulin concentration [$\mu\text{U}/\text{ml}$] \times baseline glucose concentration [mmol/l])/22.5. All families were of Spanish white descent. Informed consent was obtained from the subjects or their parents. The studies were performed according to the Declaration of Helsinki as revised in 2000 and approved by the corresponding ethical committees.

Single-strand conformation polymorphism analysis of the GCK gene Genomic DNA was isolated from human leucocytes using standard methods [21]. PCR of the ten exons of the GCK gene expressed in beta cells (GenBank accession no. AH005826) was done using previously described primer sequences [22]. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and sequencing were performed as described [19, 23].

Production of recombinant wild-type and mutant glutathione S-transferase-glucokinase Recombinant human wild-type beta cell GCK fused to glutathione S-transferase (GST; to form GST-GCK) was prepared as described previously [9]. MODY-associated mutations were introduced into the GST-GCK construct by PCR using a kit (QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene, La Jolla, CA, USA). To generate the insertion of the new asparagine residue at position 161, by insertion of bases TAA at position 483 from ATG, the following oligonucleotide was used: 5'-GAAGACATCGATAATAAGGGGATCCTTCTCAA CTGGACCAAG-3'. To generate missense mutations M235V, R308W and R397L the following oligonucleotides were used, respectively: 5'-CTGCAATGCCTGCTACGTA GAGGAGATGCAGAATG-3'; 5'-CGAGCTCGTGCGGCTTGTGCTGCTCTGGCTCGTGG-3'; and 5'-CGCG AGAGCCTCAGCGAGGACGTCATGCGCATCAC-3'. Constructs carrying mutations inserN161, M235V, R308W and R397L were checked by sequencing and digestion with BamHI, SnaBI, SacI and AatII, respectively. Expression, purification and storage of fusion proteins from E. coli were performed as described previously [19, 24].

Kinetics parameter Glucokinase activity was measured spectrophotometrically using an NADP⁺-coupled assay with glucose-6-phosphate dehydrogenase. Determination of kinetic parameters and thermal stability tests were performed as described previously [19]. Results are shown as means±SD, and statistical significance was analysed by the two-tailed Student's *t* test. *p* values of <0.02 were considered statistically significant.

In vitro translation of proteins and tests for protein-protein interactions cDNAs for *Gckr*, *Pfkfb1* and *DUSP12* were transcribed using T7 RNA polymerase, and transcripts were translated using the rabbit reticulocyte lysate TNT system (Promega, Madison, WI, USA) in the presence of [³⁵S]methionine (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). The cDNA for *Gckr* was available in the vector pGBKT7 [19]. The cDNA for the rat liver isoform of PFKFB1, cloned in the pcDNA3 vector [25], was kindly provided by R. Bartrons (Department of Physiological Sciences II, University of Barcelona, Spain). The cDNA for *DUSP12* was cloned by RT-PCR from total RNA of

the human-hepatoma-derived HepG2 cell line. RT-PCR was performed using an RT-PCR System (Titan One Tube; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and primers DUSP12F: 5'-GGGATCCCCATGTTGGTGGCTC-3' and DUSP12R: 5'-GGGATCCTCATATTTTCTCTGTTTG-3'. The 1.1-kb amplified fragment was cloned into the BamHI site of pGBKT7. The relative amounts of radio-labelled in vitro-translated proteins were determined by SDS-PAGE.

For pull-down experiments, equal amounts of GST, GST-GCK and mutant proteins bound to glutathione-agarose beads (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were incubated with [³⁵S]methionine-labelled proteins for 1 h at 4°C in the corresponding reaction buffer. The reaction buffer used to test the GCK to GCKR interaction contained 25 mmol/l HEPES buffer pH 7.1, 1 mmol/l MgCl₂, 25 mmol/l KCl, 1 mmol/l dithiothreitol, 1% Triton X-100 and Complete Protease Inhibitor (Roche Diagnostics) with either 0.5 mmol/l fructose 1-phosphate (F1P) plus 25 mmol/l glucose, or 0.5 mmol/l fructose 6-phosphate (F6P) plus 5 mmol/l glucose. The reaction buffer employed to test the GCK to PFKFB1 interaction contained 25 mmol/l HEPES buffer pH 7.4, 1 mmol/l MgCl₂, 25 mmol/l KCl, 25 mmol/l glucose, 1 mmol/l dithiothreitol, 0.1% Triton X-100 and Complete Protease Inhibitor. The reaction buffer used to test the GCK to DUSP12 interaction contained 10 mmol/l Tris buffer pH 8, 1 mmol/l EDTA, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l dithiothreitol, 0.1% Triton X-100 and Complete Protease Inhibitor. Pellets were washed five times with the corresponding reaction buffer, and precipitates were run on SDS-PAGE.

Two-hybrid analysis The *Saccharomyces cerevisiae* strain used for two-hybrid studies was Y187 (MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *gal4 Δ* , *met⁻*, *gal80 Δ* , *URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-LacZ*; Clontech, Mountain View, CA, USA). Standard genetic methods were used. Yeast cells were grown in synthetic dextrose minimal medium lacking appropriate supplements to maintain selection for plasmids [26]. For β -galactosidase assays, four different transformants were grown to mid-log phase in selective synthetic dextrose minimal medium. β -Galactosidase activity was assayed in permeabilised cells and expressed in Miller units [27]. Plasmids encoding a GCKR fusion protein to the Gal4 binding domain and a fusion of GCK to the Gal4 activating domain, have been described previously [19]. Plasmid encoding the GCK(R308W) mutant derivative was derived from pACTII (Clontech) by inserting a BamHI-XhoI fragment from the corresponding GST-GCK constructs containing the mutant GCK coding sequence between the BamHI and XhoI sites of the polylinker.

Results

Clinical profile of the patients

Clinical profile of the patients The clinical and anthropometric data from the index patients are given in Table 1. All these patients had a clinical family history of diabetes dating back at least two consecutive generations. The patients had mild fasting hyperglycaemia, ranging from 6.5 to 7.8 mmol/l. OGTT, HbA_{1c} and basal C-peptide values were within the normal ranges for MODY2 families. The proband of family P33 had a HOMA value of 4.9, indicating insulin resistance. She was on a diet plus metformin treatment. Her mother had had gestational diabetes without post-pregnancy treatment, and the mother's current fasting plasma glucose levels were 6.1 mmol/l with normal OGTT (4.8 mmol/l). None of these patients showed any chronic diabetic complications.

Identification of novel MODY2 mutations

Identification of novel MODY2 mutations The ten exons of the *GCK* gene expressed in beta cells were scanned for mutations using SSCP on the probands from each family. Sequencing of abnormal migrating bands revealed the heterozygous mutations shown in Table 1. Duplication of three bases, TAA (cDNA positions 480–482 from ATG), produced the insertion of a new asparagine residue between GCK amino acids Asp160 and Lys161 in family P33. Point mutations in *GCK* exons 8 and 7 resulted in novel missense GCK mutations R308W and M235V, found in families P35 and P42, respectively. The missense mutation R397L, found in family P38, was first reported as a homozygous mutation in an Asian infant with permanent neonatal diabetes [20]. The three novel mutations co-segregated with the MODY phenotype in the available subjects in their respective families (Table 1), and were not found in 55

unrelated healthy control individuals, who showed normal conformers of SSCP compared with the probands and their affected relatives (results not shown).

Kinetic analysis of recombinant mutant glucokinases We prepared recombinant wild-type GST-GCK and mutant GST-GCK(insertN161), GST-GCK(M235V), GST-GCK(R308W) and GST-GCK(R397L) in *E. coli* and compared the kinetic properties of the purified GST fusion proteins (Table 2). The strongest effect on GCK activity was produced by the insertion of an asparagine residue at position 161. This mutant GCK had lost catalytic activity and its activity index corresponded to less than 0.01% of that of the wild-type. Because of the very low activity of this mutant, the kinetic data shown in Table 2 are only approximations. This mutant displayed a 20-fold lower affinity for glucose than the wild-type protein and may have lost its cooperativity for this substrate, as shown by an approximate Hill coefficient (nH) close to 1. The affinity for ATP also appeared to be affected, since the Michaelis–Menten constant (K_m) was decreased by about 35%.

In contrast to the insertN161 mutation, the missense mutation R397L had only a very small effect on enzyme kinetics in vitro. Although the activity index of the GCK (R397L) mutant protein was lower than the wild-type value, the difference is not statistically significant ($p=0.1$), since this mutation did not appear to affect the substrate affinities, catalytic constant (K_{cat}) or the nH.

The other two missense mutations, M235V and R308W, produced a partial catalytic inactivation of GCK, with a reduction in the activity index of 55 % and 71 % compared with the wild-type value, respectively. The effect of the M235V mutation must have been mainly due to a decrease in K_{cat} , since substrate affinities and nH remained almost unaffected. In contrast, mutation R308W, which also produced a decrease in K_{cat} , had a slight but significant negative effect on the affinity for glucose. The affinity for

Table 1 Clinical characteristics of probands and MODY2 mutations

Family	Age at diagnosis/ actual age (years)	Patient's sex	BMI (kg/m ²)	FPG (mmol/l)	OGTT (mmol/l)	HbA _{1c} (%)	Basal C-peptide (ng/ml)	Gene exon	Nucleotide change	Protein change	Affected family members
P33	12/14	Female	22	7.8	11.0	6.0	2.3	GCK4	c.483 InsertTAA	Insert N161 ^a	M ^b , mGM ^b
P35	17/26	Female	22	7.5	12.6	5.4	0.82	GCK8	c.922A>T	R308W ^a	S ^b , F ^b , pA ^b , pGM
P38	15/24	Male	23	6.5	8.6	6.5	1.5	GCK9	c.1190G>T	R397L	F, pU
P42	27/36	Male	25	6.8	8.2	6.1	2.1	GCK7	c.703A>G	M235V ^a	M ^b , mGM

FPG, fasting plasma glucose; OGTT, plasma glucose 120 min after a 75-g OGTT. M, mother; S, sister; F, father; pA, paternal aunt; pU, paternal uncle; pGM, paternal grandmother; mGM, maternal grandmother.

Nucleotide numbering uses +1 as the A of the ATG initiation codon, based on the GenBank sequence no. AF041021.

^a Novel mutations. ^b Affected family members where mutation was checked by genotyping.

Table 2 Kinetic constants of human recombinant wild-type and MODY2 mutant beta cell GST-GCK fusion proteins

Preparation	Protein yield (mg/l)	K_{cat} (s^{-1})	$S_{0.5}$ for glucose (mmol/l)	nH	K_m for ATP (mmol/l)	I_a
Wild-type GST-GCK	14.1±5.6	55.5±8.3	7.6±0.4	1.42±0.03	0.49±0.06	1.0±0.25
GST-GCK (inserN161)	9.8±0.9	0.29±0.12 ^a	155±29.2 ^a	0.99±0.017 ^a	0.32±0.05 ^b	0.0007±0.0003 ^a
GST-GCK (M235V)	9.9±1.8	22.9±0.6 ^a	7.8±0.7	1.38±0.06	0.46±0.05	0.45±0.08 ^a
GST-GCK (R308W)	13.6±1.5	22.3±2.3 ^a	10.7±1.0 ^a	1.36±0.07	0.5±0.0	0.29±0.04 ^a
GST-GCK (R397L)	14.0±4.2	42.1±3.3	7.7±1.1	1.5±0.05	0.46±0.07	0.72±0.11

Data represent means±SD of four separate enzyme expressions tested in duplicate. Note that the Hill coefficient (nH) and the relative activity index (I_a) are unit-less. ^a $p<0.02$; ^b $p=0.037$

the second substrate, ATP, and the nH were not significantly affected.

Thermolability of glucokinase mutants To test whether additional mechanisms might be involved in the inactivation of partially impaired GCK mutants, the three missense mutant proteins were subjected to an analysis of thermal stability. Since glucose has a protective effect on GCK stability and since the half-saturation constant ($S_{0.5}$) for these mutants was almost unchanged with respect to the wild-type enzyme, we assessed the thermal stability of these mutant proteins in the presence of 50 mmol/l glucose. As shown in Fig. 1a, wild-type GCK activity was slightly activated after 30-min incubation at temperatures up to 50°C but fell at 52°C. The activity of all three GCK mutants, M235V, R308W and R397L, also increased for temperatures up to 42°C, but was significantly reduced when the temperature reached 50°C. These results indicate that all three mutations have some effect on the stability of the protein. The time-course analysis of thermal inactivation (Fig. 1b) indicates that the R308W mutation produces the strongest effect on protein stability and that 70% of GCK activity is lost within the first 15 min of incubation at 50°C. The GCK(R397L) mutant was more stable, since 50% inactivation was observed after 30 min at 50°C. In contrast, the GCK(M235V) mutant was almost unaffected over the first 15 min of incubation at 50°C and more than 50% activity was still detected after 30 min at this temperature.

Effect of glucokinase mutations on the interaction with associated proteins

The possible effect of these mutations on the interaction of GCK with associated proteins was also investigated. Pull-down experiments were performed to test the interaction of GCK and the corresponding mutants with GCKR, the bifunctional enzyme PFKFB1, and the dual phosphatase DUSP12. As shown in Fig. 2a, none of these mutations

appeared to affect the interaction of GCK with the bifunctional enzyme. Unexpectedly, the very weak in vitro binding of GCK to DUSP12 proved to be non-specific in our pull-down experiments (Fig. 2a). In addition, we failed to detect this interaction in the two-hybrid system in yeast (data not shown). Interestingly, the strength of the interaction of GCK with GCKR in pull-down assays was specifically increased by mutation R308W, but was not affected by the other three mutations (Fig. 2). Since the interaction of GCK with GCKR has been shown to be potentiated by F6P and counteracted by F1P [7], we tested the effect of the mutation R308W in the presence of either F1P plus high glucose or F6P plus low glucose in the buffer. Increased interaction of GCKR with the GCK (R308W) mutant was observed in both of the two conditions, although it was slightly better detectable when F1P plus high glucose was present in the buffer (Fig. 2b). To provide supporting evidence that mutation R308W affects the interaction between GCK and GCKR, we tested its effect in yeast two-hybrid assays. Our results showed that GCK mutation R308W induced a significantly stronger two-hybrid interaction between these two proteins (Fig. 2c).

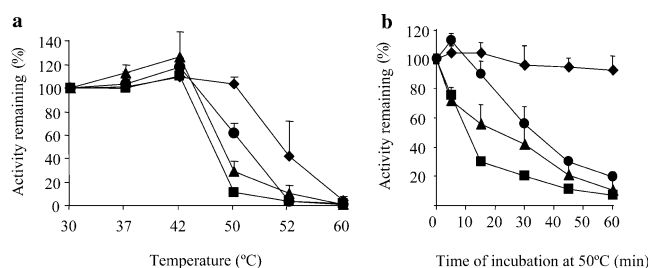


Fig. 1 Effect of temperature on the stability of the GST-GCK variants. Stock enzyme solutions were diluted to 250 µg/ml in storage buffer containing 30% glycerol, 50 mmol/l glucose, 10 mmol/l glutathione, 5 mmol/l dithiothreitol, 200 mmol/l KCl and 50 mmol/l Tris/HCl, pH 8.0. **a** The enzyme solutions were incubated for 30 min at different temperatures ranging from 30 to 55°C and then assayed at 30°C as described in Materials and methods. **b** The enzyme solutions were incubated for different periods of time from 5 to 60 min at 50°C. Rhombus, GST-GCK; circle, GST-GCK(M235V); triangle, GST-GCK(R397L); square, GST-GCK(R308W). Means and SD of three independent enzyme preparations are shown for each case

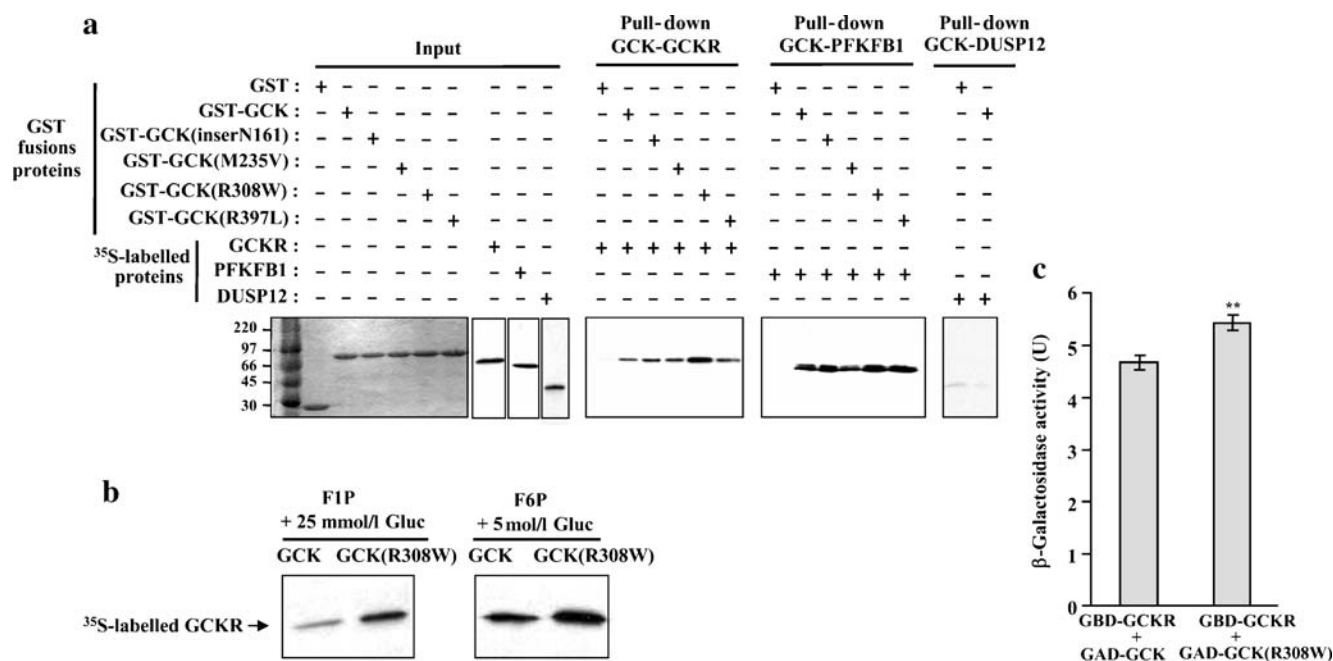


Fig. 2 Interaction of GCK and mutant derivatives with GCK-associated proteins. **a** In vitro binding of GCK to GCKR, PFKFB1 and DUSP12. GST-GCK wild-type or variants were immobilised on glutathione-agarose beads and incubated with in-vitro-synthesised ³⁵S-labelled GCKR, ³⁵S-labelled PFKFB1 and ³⁵S-labelled DUSP12. Buffer conditions, see Materials and methods section. Pull-down of GCKR was performed in the presence of 0.5 mmol/l F1P plus 25 mmol/l glucose. Pulled-down proteins were electrophoresed on 10% SDS-PAGE and detected by autoradiography. Input: purified GST fusion proteins (Coomassie) or ³⁵S-labelled proteins (autoradiography) used for binding experiments (25, 10 and 5% of the total used in the reaction mix for GCKR, PFKFB1 and DUSP12, respectively). A representative experiment from four independent assays performed for GCKR, three

for PFKFB1 and two for DUSP12 is shown. **b** Comparison of the in vitro binding of GCKR to GCK(R308W) in the presence of fructose-1-phosphate (F1P) plus high glucose or F6P plus low glucose. Pull-down assays were processed in parallel in the presence of 0.5 mmol/l F1P plus 25 mmol/l glucose or of 0.5 mmol/l F6P plus 5 mmol/l glucose. Representative experiment from three independent assays. **c** Two-hybrid interaction of GCKR with GCK or GCK(R308W) mutant. Yeast strain Y187 was used, and fusion proteins were expressed from pGBKT7 and pACTII derivatives. Values are means±SD from β-galactosidase activity of four independent transformants. ***p*=0.0004. In control experiments, GBD-GCKR did not interact with Gal4 activating domain (GAD) and GAD-GCK did not interact with Gal4 binding domain (GBD) [19]

Together, these results indicate that residue R308 is involved in the interaction of GCK with the regulatory protein.

Discussion

In this paper we report the genetic identification and functional characterisation of four *GCK* mutations found to cause MODY2 in the respective families. Three of these mutations are novel (insertN161, M235V and R308W), and one (R397L) had been identified previously in an Asian infant with permanent neonatal diabetes mellitus [20]. The novel mutations insertN161, M235V and R308W co-segregated with diabetes or impaired glucose tolerance in their respective families and were not found in over 100 chromosomes from non-diabetic control subjects.

The functional characterisation of these MODY2 mutations has uncovered different defects affecting GCK function. The insertN161 mutation fully inactivates the enzyme, while all three missense mutations produced milder kinetic effects. Furthermore, the enzymatic activity

of the protein carrying mutation R397L was almost normal in comparison with the wild-type GCK. Despite these kinetic differences, the clinical profile of the patients and the absence of diabetic complications match the MODY2 phenotype. Patient P33, carrying mutation insertN161, showed some degree of insulin resistance, which is not a common characteristic of MODY patients. However, the decreased insulin sensitivity was probably unrelated to the GCK mutation, since her mother, who carries the same mutation, has a much milder phenotype. InsertN161 is the second reported MODY2 mutation resulting in the insertion of one extra amino acid in GCK. Previous work revealed that the insertion of an alanine residue at position 454 in the allosteric activator site of GCK activated the enzyme [6]. The novel mutation found in family P33 resulted in the insertion of an asparagine residue between aspartic acid 160 and lysine 161, in the β7 strand, located in the middle of the small domain of GCK (Fig. 3). The complete loss of enzymatic activity in this mutant suggests that this beta strand would be directly involved in the active site of GCK, which is consistent with its localisation in the structural model for beta cell GCK, and with previous studies

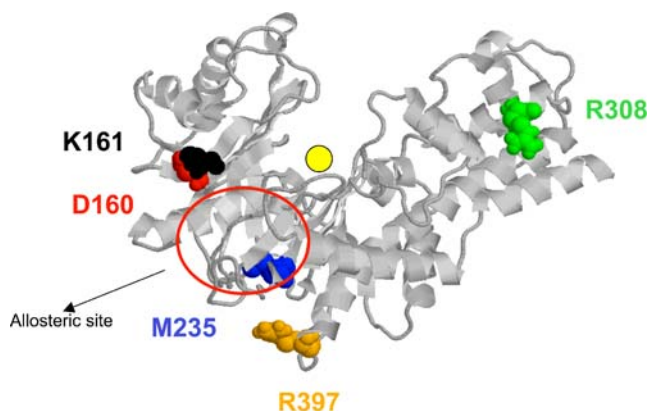


Fig. 3 Localisation of residues D160, K161, M235, R308 and R397 on the structural model for beta cell GCK. The closed conformation (1V4S) of wild-type GCK [30] is represented using the RasMol program [36]. Selected residues are indicated as clusters of coloured balls. Yellow sphere, position of glucose; red circle, allosteric site

showing that mutations of other residues in the same beta strand impair GCK activity [19, 28].

All three missense mutations are located in more external regions of the enzyme (Fig. 3) and only partially impair GCK kinetics *in vitro*. The M235 residue is located on the β -10 strand in the large domain of GCK. Enzymatic assays revealed that the M235V mutation resulted in a significant decrease in K_{cat} without affecting substrate affinities. A similar effect on K_{cat} has been described for a MODY2 mutation found in an Italian family, affecting the same residue (M235T) [29]. However, and in contrast to M235V, M235T also resulted in a decrease in the K_{m} for ATP and in the affinity for glucose. Interestingly, the crystal structure of GCK complexed with a GCK allosteric activator indicates that the M235 residue, together with residues V62, I159, M210, I211 and V452, is involved in hydrophobic interactions with this compound [30]. As expected from this model, MODY2 mutations V62M and M210K result in a loss of effect of GCK activators as well as a loss of inhibition by GCKR [18, 31]. It has been proposed that these effects could be responsible for the development of hyperglycaemia. However, our results suggest that the hyperglycaemia associated with mutation M235V is probably not related to an effect on the physical interaction of GCK with GCKR.

Mutation R397L was previously identified in an Asian infant with permanent neonatal diabetes [20]. This child had a milder phenotype than other permanent neonatal diabetes-GCK patients, suggesting to those authors that this mutation may cause a less severe kinetic defect than the previously reported mutations. The R397 residue is conserved in GCKs across species but not in hexokinases. Our functional study indicates that the R397L mutation has almost no effects on GCK kinetics. Although we found some effect of this mutation on the thermal stability of the

enzyme, these effects were relatively mild and not as pronounced as those induced by mutation R308W or previously described mutations such as E265K, E300K or S263P [17, 19, 31]. It is possible that this mild thermal lability alone might not be sufficient to account for the hyperglycaemia observed in the patients. Loss of regulation by GCKR and allosteric activators has been reported for other GCK mutants with increased or nearly-normal enzyme activity [18, 31]. Despite this, we found that the R397L mutation did not affect GCK-GCKR binding *in vitro* and was not located in the allosteric site predicted from the crystal structure [30]. A possible effect of this mutation on the interaction of GCK with other intracellular partners has been investigated. Among others, it has been reported that rat liver GCK interacts with a cytosolic dual phosphatase [12]. This phosphatase is 90% and 82% identical with mouse and human DUSP12, respectively and has been shown to increase GCK activity *in vitro* in a dose-dependent manner. Surprisingly, we failed to detect a physical interaction between human islet GCK and human DUSP12 in pull-down experiments and in yeast two-hybrid assays. This discrepancy between our results and previous findings could be related to the different origin of these proteins (rat and human). In addition to DUSP12, PFKFB1 has previously been shown to interact with GCK in yeast two-hybrid assays [10] and a physiological role for this interaction was reported in pancreatic beta cells and hepatocytes [11, 32]. We confirmed the interaction of GCK with PFKFB1 in pull-down experiments. However, the R397L mutation, as well as the other mutations studied here, did not appear to affect the binding of GCK to PFKFB1, suggesting that these residues are not involved in the interaction between these two proteins.

Mutation R308W affects the kinetics and protein stability of GCK, as well as its interaction with GCKR. Residue R308 (K308 in rodent GCK) is located in the α 8 helix, in the large domain of GCK (Fig. 3). Although this residue is distant from the active site in the structural model for GCK (Fig. 3), our results showed that the R308W mutation had significant effects on both K_{cat} and affinity for glucose. Previous studies have reported that another MODY2 mutation in a contiguous amino acid (L309P) results in a similar negative effect on K_{cat} and on substrate affinities [16, 33]. Thus, this result further supports the idea that this region of the protein could be involved in the affinity of the enzyme for glucose. The molecular mechanisms responsible for this kinetic defect could be related to a structural change resulting from this mutation. Indeed, our results indicate that the R308W mutation causes thermal instability in the protein. Most interestingly, we found that this mutation increased the strength of interaction between GCK and GCKR in both pull-down and two-hybrid assays. Different studies have

been performed to identify the regions of GCK involved in interaction with GCKR [8, 34, 35]. Residue R308 is located in a region that is involved in both GCKR binding and the nuclear export signal [8, 35]. In particular, the basic-to-hydrophobic L309R amino acid substitution has been shown to impair the interaction of GCK with GCKR in yeast two-hybrid assays [35]. In contrast, we found that the hydrophobic-to-basic substitution of the contiguous amino acid (R308W) reinforced the physical interaction with GCKR, providing further support that this region plays an important role in GCKR binding. The binding of GCKR to GCK is responsible for the inhibition and translocation of the enzyme into the nucleus. Although the physiological importance of GCK regulation by GCKR has been known for sometime, only a few MODY2 mutations have been reported to affect this regulation [18, 28, 31]. However, and contrary to what might be expected a priori, most of those mutations reduced GCK inhibition by the regulatory protein. Only one mutation (V182M), studied in kinetic assays, appeared to increase the sensitivity of GCK to the inhibitory effect produced by the regulatory protein [28]. R308W is the first MODY2 mutation in which an increase in the physical interaction of GCK with GCKR has been demonstrated. An increased association of GCKR to the mutant GCK might result in the inhibition of enzymatic activity and mislocalisation of the protein. This effect, together with the kinetic and stability defects produced by this mutation, would result in an even lower GCK activity in vivo. Taking into account the important role of GCKR in the regulation of hepatic GCK activity, a significant liver defect, in addition to the beta cell defect, might contribute to the higher blood glucose levels detected in the MODY2 patient P35.

In sum, we have identified GCK mutations causing MODY2 in diabetic families. Although the pathophysiological consequences are similar, the biochemical defects caused by these mutations are uneven and range from full kinetic inactivation to almost normal activity. Moreover, our study has allowed the identification of the first MODY2 mutation resulting in a stronger physical interaction with GCKR, further supporting the important role of this regulatory protein in the regulation of GCK activity in vivo.

Acknowledgements We thank R. Bartrons (University of Barcelona) for providing the cDNA for rat liver PFKFB1 and P. Morales (Hospital 12 de Octubre, Madrid) for providing the DNA samples of the healthy control individuals. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III grant PI030203 to M. A. Navas. M. Galán was supported by a predoctoral FPU fellowship from the Comunidad Autónoma de Madrid. M. A. Navas is a Ramón y Cajal researcher of the Spanish Ministry of Education and Science.

Duality of interest The authors are not aware of any duality of interest.

References

1. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS (2001) Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 345:971–980
2. Prisco F, Iafusco D, Franzese A, Sulli N, Barbetti F (2000) MODY 2 presenting as neonatal hyperglycaemia: a need to reshape the definition of “neonatal diabetes”? *Diabetologia* 43:1331–1332
3. Pearson ER, Velho G, Clark P et al (2001) Beta-cell genes and diabetes: quantitative and qualitative differences in the pathophysiology of hepatic nuclear factor-1alpha and glucokinase mutations. *Diabetes* 50:S101–S107
4. Matschinsky FM (1990) Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39:647–652
5. Zelent D, Najafi H, Odili S et al (2005) Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas. *Biochem Soc Trans* 33:306–310
6. Matschinsky FM (2005) Glucokinase, glucose homeostasis, and diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 5:171–176
7. Van Schaftingen E, Dethieux M, Veiga da Cunha M (1994) Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *FASEB J* 8:414–419
8. Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA (1999) Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* 274:37125–37130
9. Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Vazquez P, Blazquez E (2002) Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. *J Neurochem* 80:45–53
10. Baltrusch S, Lenzen S, Okar DA, Lange AJ, Tiedge M (2001) Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *J Biol Chem* 276:43915–43923
11. Massa L, Baltrusch S, Okar DA, Lange AJ, Lenzen S, Tiedge M (2004) Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes* 53:1020–1029
12. Munoz-Alonso MJ, Guillemain G, Kassis N, Girard J, Burnol AF, Leturque A (2000) A novel cytosolic dual specificity phosphatase, interacting with glucokinase, increases glucose phosphorylation rate. *J Biol Chem* 275:32406–32412
13. Rizzo MA, Piston DW (2003) Regulation of {beta} cell glucokinase by S-nitrosylation and association with nitric oxide synthase. *J Cell Biol* 161:243–248
14. Danial NN, Gramm CF, Scorrano L et al (2003) BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424:952–956
15. Shiraiishi A, Yamada Y, Tsuura Y et al (2001) A novel glucokinase regulator in pancreatic beta cells precursor of propionyl-CoA carboxylase beta subunit interacts with glucokinase and augments its activity. *J Biol Chem* 276:2325–2328
16. Davis EA, Cuesta-Munoz A, Raoul M et al (1999) Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and hyperglycaemia syndromes and their analysis illuminates fundamental quantitative concepts of glucose homeostasis. *Diabetologia* 42:1175–1186
17. Kesavan P, Wang L, Davis E et al (1997) Structural instability of mutant beta-cell glucokinase: implications for the molecular pathogenesis of maturity-onset diabetes of the young (type-2). *Biochem J* 322:57–63
18. Gloyd AL, Odili S, Zelent D et al (2005) Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation

- (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young. *J Biol Chem* 280:14105–14113
19. Galan M, Vincent O, Roncero I et al (2006) Effects of novel maturity-onset diabetes of the young (MODY)-associated mutations on glucokinase activity and protein stability. *Biochem J* 393:389–396
 20. Porter JR, Shaw NJ, Barrett TG, Hattersley AT, Ellard S, Gloyn AL (2005) Permanent neonatal diabetes in an Asian infant. *J Pediatr* 146:131–133
 21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
 22. Stoffel M, Froguel P, Takeda J et al (1992) Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7698–7702
 23. Navas MA, Vaisse C, Boger S, Heimesaat M, Kollee LA, Stoffel M (2000) The human HNF-3 genes: cloning, partial sequence and mutation screening in patients with impaired glucose homeostasis. *Hum Hered* 50:370–381
 24. Liang Y, Kesavan P, Wang LQ et al (1995) Variable effects of maturity-onset-diabetes-of-youth (MODY)-associated glucokinase mutations on substrate interactions and stability of the enzyme. *Biochem J* 309:167–173
 25. Perez JX, Roig T, Manzano A et al (2000) Overexpression of fructose 2,6-bisphosphatase decreases glycolysis and delays cell cycle progression. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C1359–C1365
 26. Rose MD, Winston F, Hieter P (1990) Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
 27. Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
 28. Veiga-da-Cunha M, Xu LZ, Lee YH, Marotta D, Pilkis SJ, Van Schaftingen E (1996) Effect of mutations on the sensitivity of human beta-cell glucokinase to liver regulatory protein. *Diabetologia* 39:1173–1179
 29. Gloyn AL, Odili S, Buetter C, Njolstad PR, Shiota C, Magnuson MA, Matschinsky FM (2004) Glucokinase and the regulation of blood sugar. A mathematical model predicts the threshold for glucose stimulated insulin release for GCK gene mutations that cause hyper- and hypoglycemia. In: Matschinsky FM, Magnuson MA (eds) Glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics. Front. Diabetes. Vol 16, Karger, Basel, Switzerland, pp 92–109
 30. Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y (2004) Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12:429–438
 31. Sage JV, Odili S, Bjorkhaug L et al (2006) From clinicogenetic studies of maturity-onset diabetes of the young to unraveling complex mechanisms of glucokinase regulation. *Diabetes* 55:1713–1722
 32. Payne VA, Arden C, Wu C, Lange AJ, Agius L (2005) Dual role of phosphofructokinase-2/fructose biphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes. *Diabetes* 54:1949–1957
 33. Gidh-Jain M, Takeda J, Xu LZ et al (1993) Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1932–1936
 34. Veiga-da-Cunha M, Courtois S, Michel A, Gosselain E, Van Schaftingen E (1996) Amino acid conservation in animal glucokinases. *J Biol Chem* 271:6292–6297
 35. Baltrusch S, Francini F, Lenzen S, Tiedge M (2005) Interaction of glucokinase with the liver regulatory protein is conferred by leucine-asparagine motifs of the enzyme. *Diabetes* 54:2829–2837
 36. Sayle RA, Milner-White EJ (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci* 20:374–376

Functional Characterization of MODY2 Mutations Highlights the Importance of the Fine-Tuning of Glucokinase and Its Role in Glucose Sensing

Carmen-María García-Herrero^{1,2}, Oscar Rubio-Cabezas^{3,4}, Sharona Azriel⁵, Angel Gutierrez-Nogués¹, Angel Aragonés⁶, Olivier Vincent⁷, Angel Campos-Barros^{3*}, Jesús Argente^{3,4}, María-Angeles Navas^{1,2*}

1 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid and Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM), url: www.ciberdem.net, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **3** Servicio de Endocrinología, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Instituto de Investigación La Princesa and Departamento de Pediatría, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, **4** Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), url: www.ciberobn.es, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **5** Servicio de Endocrinología, Hospital Universitario Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain, **6** Servicio de Pediatría, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain, **7** Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Glucokinase (GK) acts as a glucose sensor in the pancreatic beta-cell and regulates insulin secretion. Heterozygous mutations in the human GK-encoding *GCK* gene that reduce the activity index increase the glucose-stimulated insulin secretion threshold and cause familial, mild fasting hyperglycaemia, also known as Maturity Onset Diabetes of the Young type 2 (MODY2). Here we describe the biochemical characterization of five missense GK mutations: p.Ile130Thr, p.Asp205His, p.Gly223Ser, p.His416Arg and p.Ala449Thr. The enzymatic analysis of the corresponding bacterially expressed GST-GK mutant proteins show that all of them impair the kinetic characteristics of the enzyme. In keeping with their position within the protein, mutations p.Ile130Thr, p.Asp205His, p.Gly223Ser, and p.His416Arg strongly decrease the activity index of GK, affecting to one or more kinetic parameters. In contrast, the p.Ala449Thr mutation, which is located in the allosteric activator site, does not affect significantly the activity index of GK, but dramatically modifies the main kinetic parameters responsible for the function of this enzyme as a glucose sensor. The reduced K_{cat} of the mutant ($3.21 \pm 0.28 \text{ s}^{-1}$ vs $47.86 \pm 2.78 \text{ s}^{-1}$) is balanced by an increased glucose affinity ($S_{0.5} = 1.33 \pm 0.08 \text{ mM}$ vs $7.86 \pm 0.09 \text{ mM}$) and loss of cooperativity for this substrate. We further studied the mechanism by which this mutation impaired GK kinetics by measuring the differential effects of several competitive inhibitors and one allosteric activator on the mutant protein. Our results suggest that this mutation alters the equilibrium between the conformational states of glucokinase and highlights the importance of the fine-tuning of GK and its role in glucose sensing.

Citation: García-Herrero C-M, Rubio-Cabezas O, Azriel S, Gutierrez-Nogués A, Aragonés A, et al. (2012) Functional Characterization of MODY2 Mutations Highlights the Importance of the Fine-Tuning of Glucokinase and Its Role in Glucose Sensing. PLoS ONE 7(1): e30518. doi:10.1371/journal.pone.0030518

Editor: Beata G. Vertessy, Institute of Enzymology of the Hungarian Academy of Science, Hungary

Received: September 29, 2011; **Accepted:** December 17, 2011; **Published:** January 24, 2012

Copyright: © 2012 García-Herrero et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (grants PI02/1663 and PI06/90459 to AC-B; grants PI06/0153 and PI10/00424 to M-AN) and the Dirección General de Universidades e investigación de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid-Universidad Complutense de Madrid (grant CCG10-UCM/BIO-4728 to M-AN). CMG-H was supported by a predoctoral FPU fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. OR-C was supported by a Río-Hortega research training fellowship from the Instituto de Salud Carlos III (CM06/00013). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: manavas@med.ucm.es

† Current address: Instituto de Genética Médica y Molecular, IdiPaz, Hospital Universitario La Paz and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), www.ciberer.es, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Introduction

Glucokinase (GK) plays a key role as the pancreatic beta-cell glucose sensor by integrating blood glucose levels and glucose metabolism with insulin secretion [1]. Besides the beta-cell, GK is expressed in other neuroendocrine cells and in hepatocytes, which participate in a network of cells involved in the body glucose homeostasis [2]. This enzyme (also called hexokinase IV) is one of the four hexokinase isoforms that catalyze the first reaction of glycolysis converting glucose into glucose-6-phosphate (G6P) with ATP as second substrate. The specific function of GK as a glucose sensor is based on the particular regulatory characteristics of this enzyme, as compared with the other

hexokinase isoforms, which are low affinity for glucose ($S_{0.5}$ 7–9 mM, cooperativity with this substrate (Hill coefficient ≈ 1.7) and lack of end-product inhibition at physiological concentrations of G6P. In addition, and also in contrast to other hexokinase isoforms, glucokinase activity might be modified by protein interaction partners that can modulate the catalytic activity and the intracellular distribution of the enzyme in beta-cells and/or hepatocytes (for review see [3] [4] [5]. Yet, the best known regulator of GK in the liver is the glucokinase regulatory protein (GKRP) that acts as a competitive inhibitor with respect to glucose and regulates the nucleo-cytoplasmic localization of the enzyme to stabilize a protein reservoir of the enzyme in the nucleus when its activity is not necessary [6] [7] [8].

The crucial role of GK on beta-cell function is illustrated by the fact that over 600 mutations in the *GCK* gene cause different monogenic glycaemic disorders (for review see [9]). Thus, heterozygous activating mutations cause persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy (HI). In contrast, homozygous inactivating mutations cause complete GK deficiency and permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM), whereas heterozygous inactivating mutations cause familial, mild fasting hyperglycaemia also known as maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY2; [10] [11]). MODY2 patients show mild fasting hyperglycaemia (5.5–8.0 mM) present from birth but usually are asymptomatic and most remain undiagnosed until later in life [12]. These patients show little deterioration with age and usually do not require any specific treatment [13]. The principal pathophysiological mechanism of altered glycaemia in patients with GK mutations is a beta-cell dysfunction characterized by a modification in the blood glucose threshold that triggers insulin secretion, which is consistent with a defect in glucose sensing [14] [15]. In addition, abnormalities in liver glucose metabolism contribute to the hyperglycaemia in patients with MODY2 [16]. Due to its central role in controlling body glucose homeostasis, GK has been considered as an outstanding drug target for developing new antidiabetic therapies and several small molecular activators (GKAs) have been discovered (for review see [5] [17]).

The determination of the human GK crystal structure defined the active and allosteric activator sites and revealed the basis for the catalytic mechanism of this enzyme thus allowing researchers to analyze disease-associated mutations at the molecular level [18]. The functional characterization of naturally occurring GK mutations has contributed to better knowledge of the biochemistry of this enzyme. Activating mutations involved in HI increase glucose affinity and most of them are clustered at the allosteric activator site where GKAs bind [9] [18]. In contrast, hyperglycaemia causing mutations are located throughout the protein and most of them show a lower activity index, due to a reduction in substrate affinity combined or not with decreased catalytic turnover, which leads to an increased threshold for glucose-stimulated insulin release [9] [19].

The present work reports the functional analysis of five missense GK mutations: p.Ile130Thr, p.Asp205His, p.Gly223Ser, p.His416Arg and p.Ala449Thr. The biochemical characterization of these mutations shows that most of them are inactivating mutations decreasing the activity index of the enzyme. Unexpectedly, the p.Ala449Thr mutation shows an overall activity index that does not differ significantly from that of the wild type. In contrast, it dramatically modifies the main kinetic parameters responsible for the function of GK as a glucose sensor. By studying

the effect of one allosteric activator and some competitive inhibitors on enzymatic activity, we analyzed the mechanisms by which this mutation, located in the allosteric activator site, impairs GK fine tuning.

Materials and Methods

Patients and mutation analysis of the GCK gene

The diabetic patients involved in this study were referred to our laboratories for molecular testing of MODY2. The clinical diagnosis was made using classical criteria [11]. All families were of Spanish Caucasian descent with the exception of patient 4 who was of Asian descent. Written informed consent was obtained from the subjects or their parents. The studies were performed according to the Declaration of Helsinki as revised in 2000 and approved by the local Clinical Research Ethical Committees of the two centres which conducted human genetic studies (Hospital Clínico San Carlos/Universidad Complutense de Madrid and Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid).

Mutation analysis of the *GCK* gene was performed as previously described [20] [21].

Production of recombinant wild-type and mutant glutathionyl-S-transferase-glucokinase (GST-GK) fusion proteins

Recombinant human wild-type beta-cell glucokinase fused to GST (GST-GK) was prepared as described previously [22]. MODY-associated mutations were introduced into the GST-GK construct by PCR using the QuikChange® II Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, Calif., USA). To generate missense mutations p.Ile130Thr, p.Asp205His, p.Gly223Ser, p.His416Arg and p.Ala449Thr the following oligonucleotides were used, respectively: 5'-ctacatctctgagtcacctccgacttcctggac-3', 5'-gatgtgtggccatggtgaatcacacggtggccacg-3', 5'-gaggtcagcatgatcgtgggcacgggtgcaatgcatgctac-3', 5'-ctccgtgtacaagctgcgcccaagcttcaaggag-3', and 5'-gaggaggcagcgccgggcacggccctgctg-3'. Constructs carrying mutations p.Ile130Thr, p.Asp205His, p.Gly223Ser, p.His416Arg and p.Ala449Thr were checked by sequencing and digestion with ApaLI, NcoI, NsiI, HindIII and Eco52I, respectively. The expression and purification of fusion proteins from *E. coli* was performed as described previously [22]. Fusion proteins were stored at a concentration of about 1 mg/ml at -80°C in 30% glycerol, 50 mM glucose, 10 mM glutathione, 5 mM DTT, 200 mM KCl and 50 mM Tris/HCl pH=8.0. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, GmbH), with bovine serum albumin

Table 1. Clinical characteristics of probands and *GCK* mutations.

Family	Age at diagnosis/ Current age (years)	Patient sex	BMI (kg/m ²)	FPG (mM)	OGTT (mM)	HbA _{1c} (%)	Nucleotide change	Protein change	Affected family members
1	3 yr3 mo/21	Female	15	6.1	5.8	5.8	c.389T>C	p.Ile130Thr	<u>F</u> , pGF
2	11 yr6 mo/19	Male	16.6	6.8	9.3	6.5	c.613G>C	p.Asp205His	<u>M</u> , <u>S</u> , mGF, mGM
3	13/19	Male	17	7.2	10.2	6.3	c.667G>A	p.Gly223Ser	<u>F</u>
4	1 yr11 mo/9	Female	17	6.3	11.1	5.7	c.1247A>G	p.His416Arg	Adopted
P99	27/31	Female	28	7.4	NA	NA	c.1345G>A	p.Ala449Thr	pGF, <u>F</u>

BMI: body mass index; FPG: fasting plasma glucose; OGTT: plasma glucose at 120 min after a standard oral glucose tolerance test (1.75 g per kg, máx. 75 g). Nucleotide numbering uses +1 as the A of the ATG initiation codon, based on the GenBank sequence # NM_000162. F, father; M, mother; S, sister; pGF, paternal grandfather; mGF, maternal grandfather; mGM, maternal grandmother. NA, not analysed. Underlined are those affected family members where mutation was checked by genotyping. Novel mutations are shown in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0030518.t001

Table 2. Kinetic constants of human recombinant wild type and MODY2 mutant beta-cell GST-GK fusion proteins.

Preparation	Protein yield (mg/l)	Kcat (s^{-1})	S _{0.5} for glucose (mM)	nH	Km for ATP (mM)	I _a
Wild-type GST-GK (n = 7)	4.83 ± 0.02	47.86 ± 2.78	7.86 ± 0.09	1.49 ± 0.02	0.54 ± 0.01	1.0 ± 0.09
GST-GK (p.Ile130Thr) (n = 4)	14.3 ± 0.14	2.88 ± 0.29*	8.59 ± 0.45	1.01 ± 0.02*	0.13 ± 0.02**	0.17 ± 0.03*
GST-GK (p.Asp205His) (n = 2)	7.7/3.3	No activity at all				
GST-GK (p.Gly223Ser) (n = 5)	7.75 ± 0.07	12.90 ± 0.52*	44.0 ± 3.81*	1.13 ± 0.01*	1.60 ± 0.1*	0.064 ± 0.010*
GST-GK (p.His416Arg) (n = 4)	6.55 ± 0.003	1.02 ± 0.08*	67.9 ± 2.27*	1.00 ± 0.02*	3.74 ± 0.10*	0.003 ± 0.0004*
GST-GK (p.Ala449Thr) (n = 6)	9.65 ± 0.065	3.21 ± 0.28*	1.33 ± 0.08*	0.95 ± 0.02*	1.81 ± 0.08*	1.23 ± 0.16

Data represent means ± SEM of *n* separate experiments from at least two independent enzyme purifications. The Hill coefficient (nH) and the relative activity index (I_a) are unit less. (*) $p < 0.0007$; (**) $p = 0.012$.
doi:10.1371/journal.pone.0030518.t002

as standard. GST-GK purifications resulted in single bands of 75 kDa on Coomassie-stained SDS-PAGE.

Kinetic and structural analysis of the GK protein

Glucokinase activity was measured spectrophotometrically on a spectrophotometer Uviconxl (Secoman), using an NADP⁺-coupled assay with glucose-6-phosphate dehydrogenase, as described previously [22]. The final reaction mixture contained 100 mM Tris pH 7.4, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.4 mM β-mercaptoethanol, 0.1% BSA, 5 mM ATP-MgCl₂, 1 mM NADP⁺, and 1 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase. Determination of kinetic parameters and thermal stability tests were performed as in [20]. Km for ATP was measured at a glucose concentration corresponding to the S_{0.5} value for GST-GK wild-type and mutant proteins (8, 9, 40, 70 and 3 mM, for wild-type, GST-GK(p.Ile130Thr), GST-GK(p.Gly223His), GST-GK(p.His416Arg) and GST-GK(p.Ala449Thr), respectively). The relative activity index was calculated as previously [19]. Concentrations of inhibitors causing 50% inhibition (I₅₀) were derived from Dixon plots [23],

using different concentrations of glucose (2, 5 and 8 mM for the wild-type protein, 12.5, 25 and 50 mM or 1, 1.5 and 2 mM for proteins carrying mutations p.Gly223Ser and p.Ala449Thr, respectively), and five concentrations of inhibitors (0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 mM for N-acetylglucosamine (NAG); 0.5, 1, 2, 5 and 10 mM for mannoheptulose (MH) and 1, 2, 5, 10 and 15 μM for palmitoyl-CoA). Inhibition by NAG and MH was determined under standard assay conditions with 50 nM glucokinase [22]. The inhibition by palmitoylCoA was determined in reaction mixtures containing 25 mM Hepes pH 7.1; 25 mM KCl; 1 mM NADP, 1 mM ATP-MgCl₂; 2.5 mM MgCl₂; 5 mM β-mercaptoethanol, 1 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase and 61 nM glucokinase [24]. Due to the low Kcat value of mutant GST-GK(p.Ala449Thr), the amount of protein used in inhibition assays was 180 nM to get sufficient activity to allow for accurate determination of the inhibitor effect. In these conditions, GK activity (U/mg of GST-GK(p.Ala449Thr)) in the absence of inhibitors was 1.3 ± 0.08, 1.1 ± 0.06 and 0.9 ± 0.05 at 2, 1.5 and 1 mM of glucose, respectively for NAG and MH assays and

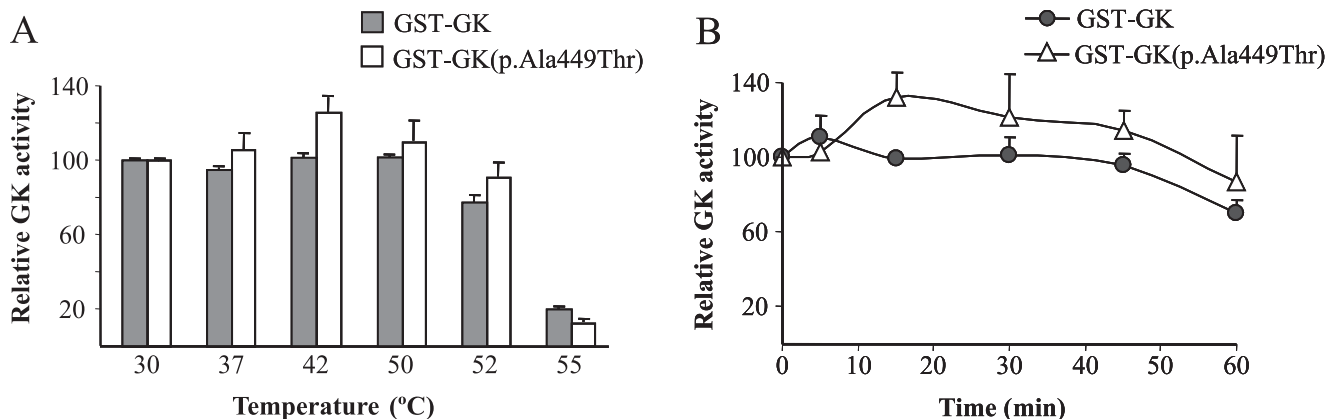


Figure 1. Effect of temperature on the stability of the GST-GK(p.Ala449Thr) protein. Stock enzyme solutions were diluted to 250 μg/ml in buffer containing 30% glycerol, 50 mM glucose, 10 mM glutathione, 5 mM dithiothreitol, 200 mM KCl and 50 mM Tris/HCl, pH 8.0. A) The enzyme solutions were incubated for 30 min at different temperatures ranging from 30 to 55°C and then assayed at 30°C as described in Material and Methods. B) The enzyme solutions were incubated for different periods of time from 5 to 60 min at 50°C. Means and SEM of three independent enzyme preparations are shown.
doi:10.1371/journal.pone.0030518.g001

0.5±0.05, 0.33±0.03 and 0.27±0.03 at 2, 1.5 and 1 mM glucose, respectively for palmitoyl-CoA assay.

Purified human GKRP was kindly provided by KJ Brocklehurst (Cardiovascular and Gastrointestinal Department, AstraZeneca, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, UK). The effect of GKRP on glucokinase activity was determined as described [25]. The final reaction mixture contained 25 mM Hepes pH 7.1; 25 mM KCl; 1 mM NADP, 1 mM ATP-MgCl₂; 2.5 mM MgCl₂; 5 mM β-mercaptoethanol, 1 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, 61 nM of GST-GK or 180 nM GST-GK(pAla449Thr), 5 mM glucose, GKRP (0 to 200 nM) and, when indicated, 10 μM sorbitol-6-phosphate (S6P) or 0.2 mM fructose-1-phosphate (F1P). In these conditions, GST-GK(pAla449Thr) activity in the absence of GKRP was 0.8±0.09 U/mg of protein.

One unit of GK is defined as the amount of enzyme that phosphorylates 1 μmol of glucose per min at 30°C.

GK activator LY2121260 was kindly provided by Elli Lilly and Co, Indianapolis, IN, USA. A stock solution of 1 mM LY2121260 was prepared in 12.5 mM Hepes pH 7.4 with 80% DMSO. Results are shown as means ± SEM, and statistical significance was analysed by the two-tailed Student's t-test. *P* values of <0.05 were considered statistically significant. The structural analysis of mutations was carried out using the crystal structure of human GK [18] and visualized using the Pymol Molecular Graphics System (Schrödinger).

Two-hybrid analysis

Two-hybrid studies were performed in *S. cerevisiae* strain Y187 as described previously [20]. Plasmids encoding a GKRP fusion

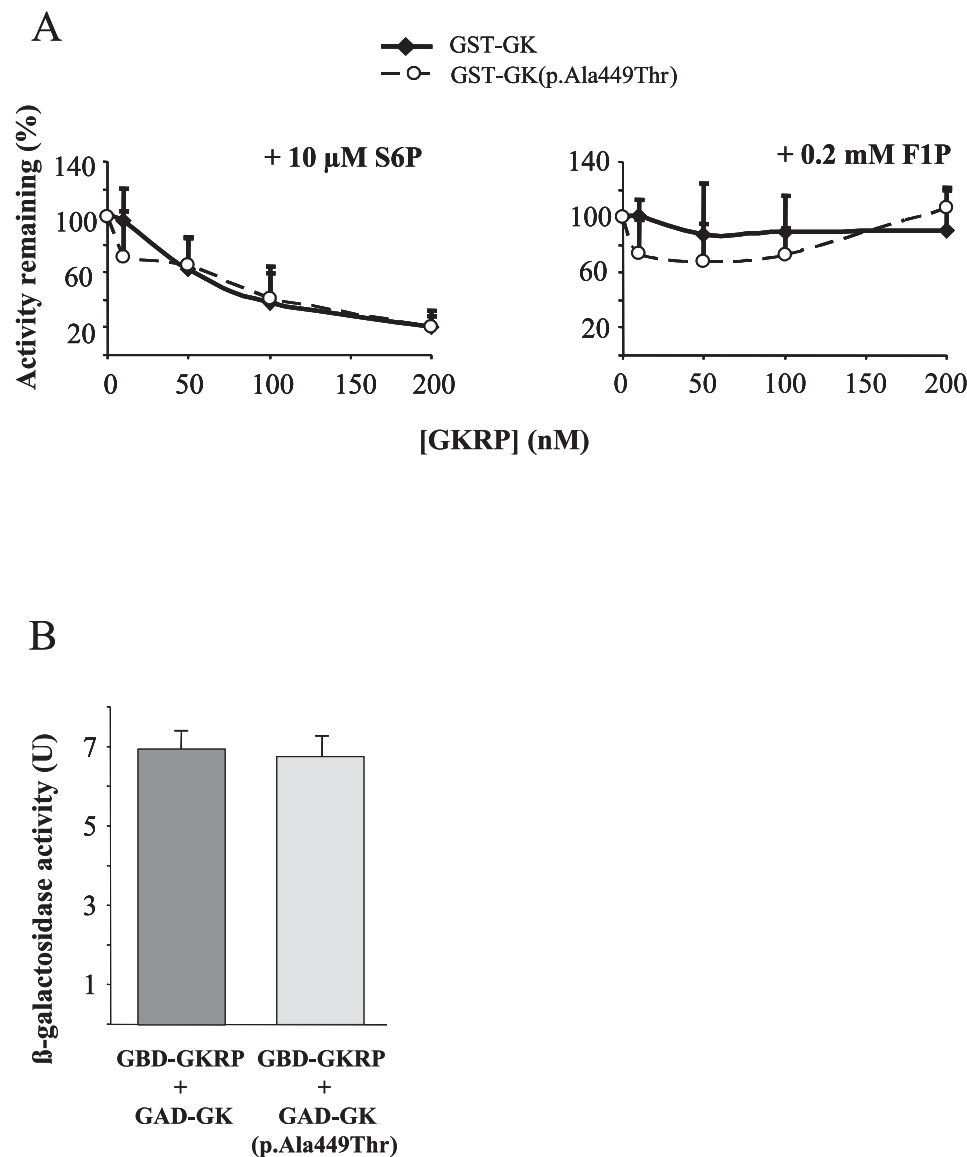


Figure 2. Effect of mutation p.Ala449Thr on the GK interaction with GKRP. A) Inhibition of glucokinase activity by human GKRP. Enzyme activity was measured at 5 mM glucose as described in Material and Methods, in the presence of 10 μM S6P (left panel) or 0.2 mM F1P (right panel). Results are means ± SEM for three independent enzyme purifications assayed in triplicate. B) Two-hybrid interaction of GBD-GKRP with GAD-GK or GAD-GK(p.Ala449Thr) mutant. Yeast strain Y187 was used, and fusion proteins were expressed from pGBKT7 and pACTII derivatives. Values are means ± SEM from β-galactosidase activity of six independent transformants. In control experiments, GBD-GKRP did not interact with GAD and GAD-GK did not interact with GBD [22].

doi:10.1371/journal.pone.0030518.g002

protein to the Gal4 Binding Domain (GBD) in the pGBKT7 vector (Clontech) and a fusion of GK to the Gal4 Activating Domain (GAD) in the pACTII (Clontech), have been described previously [22]. Plasmid encoding the GK(p.Ala449Thr) mutant derivative was derived from pACTII by inserting a BamHI-XhoI fragment from the GST-GK(p.Ala449Thr) construct containing the mutant GK coding sequence between the same sites of the polylinker.

Results

Clinical features of probands and mutations in the GCK gene

Table 1 shows the clinical presentation of probands in the 5 families, consistent with a clinical diagnosis of MODY2 in all cases. All of these patients were treated with diet alone. A *GCK* heterozygous missense mutation was identified in each family. Three mutations (p.Ile130Thr, p.Gly223Ser, and p.Ala449Thr) had been previously reported as a cause of MODY [9] [26]. Two mutations were novel (p.Asp205His, p.His416Arg). Proband 2 inherited the p.Asp205His mutation from his affected mother; it was also found in an affected sister but not in his unaffected father. Proband 4 had been adopted from China and DNA from her biological relatives was not available for testing.

Biochemical analysis of recombinant mutant glucokinases

Recombinant wild-type GST-GK and mutants GST-GK(p.Ile130Thr), GST-GK(p.Asp205His), GST-GK(p.Gly223Ser), GST-GK(p.His416Arg) and GST-GK(p.Ala449Thr) were prepared in *E. coli*. Kinetic parameters of purified fusion proteins are shown in Table 2. Mutation p.Asp205His produced the strongest effect on GK, since this mutant enzyme showed no measurable activity despite the good protein yield obtained after purification. Mutants GST-GK(p.Ile130Thr), GST-GK(p.Gly223Ser) and GST-GK(p.His416Arg) showed an overall activity lower than 20, 10 and 0.5% of the wild-type protein respectively, which is reflected in the relative activity index (I_a) values. Among these mutations p.Gly223Ser and p.His416Arg significantly affected all the kinetic parameters. Both mutations decreased the affinity of GK for both substrates glucose and ATP, and also decreased the catalytic constant (K_{cat}) and the Hill coefficient (n_H) of the enzyme. In contrast, mutation p.Ile130Thr, which also decreased the K_{cat} and the n_H , increased the affinity of GK for ATP without modifying the affinity for glucose.

Mutant GST-GK(p.Ala449Thr) had an *in vitro* activity index slightly higher than the wild-type protein, although this difference was not statistically significant ($p = 0.11$). However, and despite this apparent normal activity level, this mutation affects all the kinetic parameters of GK individually. The mutant protein GST-GK(p.Ala449Thr) lacked the cooperativity for glucose, as shown by a significantly decreased Hill coefficient. The K_{cat} of this mutant was reduced to 7% of the wild-type value and the affinity for ATP was decreased more than 3-fold. In contrast, and unusually for MODY2 mutations, affinity for glucose was strongly increased in about 5-fold. The protein stability of mutant GST-GK(p.Ala449Thr) was tested at different temperatures and compared to that of the wild-type fusion protein. Figure 1A shows that the activity of both wild type and mutant GST-GK(p.Ala449Thr) was not significantly altered after 30 minutes of incubation up to 52°C but drastically fell at 55°C. Additionally, no significant differences in the relative activity were observed between both proteins when incubated up to 60 min at the

constant temperature of 50°C (Figure 1B). These results indicate that mutation p.Ala449Thr did not confer thermal instability.

To further investigate the mechanism by which mutation p.Ala449Thr increased the affinity of GK for glucose, we tested the effects on both mutant and wild-type enzymes, of some competitive GK inhibitors such as N-acetylglucosamine (NAG), mannoheptulose (MH), palmitoyl-CoA, as well as the glucokinase regulatory protein (GKRP). Palmitoyl-CoA and GKRP bind to distinct allosteric sites, whereas glucose analogues NAG and MH bind to the catalytic site of the open and closed conformations, respectively [27]. It has been described that mutations of residues in the catalytic site affect the affinities for glucose, MH and NAG, whilst mutations of residues distant from the catalytic site affect the affinity for glucose and MH but not for NAG [28], [29], [27]. In addition, it has been previously proposed that differences in GKRP binding affinity between GK mutants reflect the mechanism by which mutations increase the glucose binding affinity [30]. As shown in Figure 2A, enzymatic inhibition by GKRP in the presence of either S6P or F1P was the same for the wild type and GST-GK(p.Ala449Thr) mutant. Lack of effect of this mutation on the GK-GKRP protein-protein interaction was corroborated by the two-hybrid system in yeast (Figure 2B). The sensitivity of GK to NAG, MH and palmitoyl-CoA was measured for both GST-GK(p.Ala449Thr) and GST-GK(p.Gly223Ser) mutant proteins, the latter showing a strongly decreased glucose affinity but still measurable enzymatic activity. The inhibition profiles for GST-GK activity are shown in Figure 3. Table 3 shows that the sensitivity of GK to these inhibitors, which is reflected by the I_{50} value, is significantly affected for the GK(p.Gly223Ser) mutant with respect to the wild-type enzyme. In contrast, mutation p.Ala449Thr did not affect the inhibition by NAG but decreased the I_{50} for MH and palmitoyl-CoA by about 35 and 26%, respectively.

Finally, we studied the effects of the GK synthetic allosteric activator LY2121260 on the kinetic parameters of GST-GK(p.A-

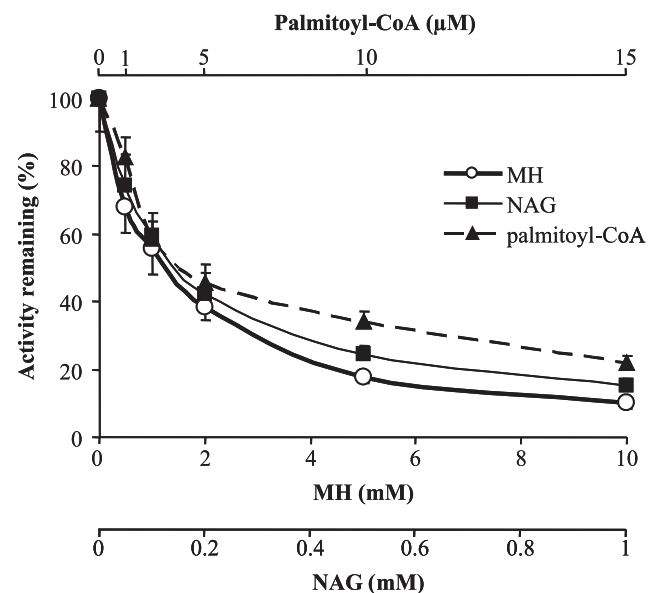


Figure 3. Inhibition of GK activity by mannoheptulose (MH), N-acetylglucosamine (NAG) and palmitoyl-CoA. The GST-GK enzyme was assayed at 5 mM glucose with the indicated concentration of inhibitors as described in Material and Methods. Means and SEM of three independent enzyme preparations are shown. doi:10.1371/journal.pone.0030518.g003

Table 3. Effect of MODY2 mutations p.Gly223Ser and p.Ala449Thr on the affinity of GK for N-acetylglucosamine (NAG), mannoheptulose (MH) and palmitoyl-CoA.

Preparation	I ₅₀ for NAG (mM)	I ₅₀ for MH (mM)	I ₅₀ for palmitoyl-CoA (μM)
Wild-type GST-GK	0.21±0.04	1.15±0.37	3.06±0.27
GST-GK(p.Gly223Ser)	0.38±0.045**	3.55±0.63**	1.42±0.13**
GST-GK(p.Ala449Thr)	0.20±0.06	0.67±0.04**	2.24±0.14*

Concentrations of inhibitors causing 50% inhibition (I₅₀) were derived from Dixon plots as described in Materials and Methods. Data represent means ± SEM of at least four separate experiments from at least two independent enzyme purifications. (**) $p < 0.006$. (*) $p = 0.03$.
doi:10.1371/journal.pone.0030518.t003

la449Thr) and compared them to those on the GST-GK wild-type protein (Table 4). For the wild-type fusion protein, the K_{cat} was increased by about 30% and the affinity for glucose was about 5 fold higher in the presence of 10 μM of this activator. In contrast, LY2121260 did not affect GST-GK(p.Ala449Thr) S_{0.5}, but produced a slight recovery of K_{cat} up to about 20% of the normal wild-type value.

Discussion

In this report we describe the functional analysis of five *GCK* mutations identified in probands with familial, mild fasting hyperglycaemia. The biochemical characterization of these mutations has shown that all of them impair normal glucokinase activity. The molecular analysis of these mutations revealed the particular defects caused in GK enzymatic activity.

The structural data obtained from the free and substrate/activator bound GK crystals showed that this enzyme has a small and a large domain separated by a deep cleft where substrates bind [18]. Glucokinase may adopt three structural conformations. In the absence of glucose, GK is in an inactive *super-open* conformation. Following glucose binding, the enzyme undergoes a conformational change leading to, first, an intermediate *open* conformation and then, a fully active *closed* conformation, which binds ATP. The transition between the super-open and closed conformations involves the rotation and approximation of the small domain to the large one. The existence of GK in different conformations allows two catalytic cycles, fast and slow, that explain the sigmoidal response to glucose [18]. Asp205, His416 and Gly223 are highly conserved amino acids among glucokinases and hexokinases and, in agreement with their localization within or in close proximity to the catalytic site (Figure 4), are essential for GK activity as shown by the strongest overall activity defects produced by mutations p.Asp205His, p.His416Arg and p.Gly223Ser. Our results show that the novel mutation p.Asp205His abolishes GK enzymatic activity. This result was predictable since the interaction between Asp205 and glucose is necessary to trigger the conformational change between the inactive and active conformations of GK [18]. Mutations p.His416Arg and p.Gly223Ser severely inactivated the enzyme by impairment of all kinetic parameters. Gly223 and His416 do not interact directly with glucose or ATP, but they are part of the active site of GK along with other neighbouring residues [31] [18] [32] [33]. His416 is located in the α11' helix in the large domain (Figure 4A). The larger size of the side chain of the arginine residue in the p.His416Arg mutation would be projected into surrounding α helices and could force a structural reorganization of that region of the protein (Figure 4B). Gly223 is localized in the β9 strand, in the large domain (Figure 4A and 4C). The change of a small residue, glycine, to serine could also produce steric impediments with surrounding residues Thr206 and Met210 in the α5 helix, which

are inside the active site and were previously found to be important for GK activity [19] [34] [35] [22]. In contrast to Asp205, His416 and Gly223, Ile130 is located in a peripheral position far from the catalytic site, in the α3 helix within the small domain (Figure 4A). This residue is projected into the hydrophobic core of the small domain. Mutation p.Ile130Thr introduces a polar residue in this hydrophobic region, which might alter the stability of the core and the structure and dynamics of the domain (Figure 4D). Accordingly, our biochemical analyses have shown that the decrease in K_{cat} is the main deleterious defect caused by mutation p.Ile130Thr on GK activity. Although affinity for glucose is not altered by this mutation, the affinity for the second substrate, ATP is increased. This latter effect was also observed for the MODY2 mutation p.Ser131Pro [36], suggesting a role of this region of the protein in the regulation of the affinity for this substrate.

The activity index obtained from the kinetic analyses of these mutants might be sufficient to explain the pathogenic effect of mutations p.Asp205His, p.His416Arg, p.Gly223Ser and p.Ile130Thr, since there is a direct relationship between this parameter and the glucose-stimulated insulin secretion threshold in a heterozygous mutant [19] [34]. However, this rule does not apply for mutation p.Ala449Thr since the corresponding activity index does not differ significantly from that of the wild type enzyme. This mutation did not confer thermal instability, suggesting that it does not affect the stability of the protein. In addition, possible defects in the regulation of this mutant by GKRP in the liver are unlikely since this mutation has no effect on the interaction of GK with GKRP. In contrast, the main kinetic characteristics of glucokinase, which play a key role in the function of this enzyme as a glucose sensor, *ie* low affinity for glucose and cooperativity, are lost in this mutant protein.

Table 4. Effect of GK synthetic activator LY2121260 on wild type and mutant GST-GK fusion proteins.

Preparation	K _{cat} (%)		S _{0.5} for glucose (mM)	
	Buffer	LY2121260	Buffer	LY2121260
Wild-type GST-GK	100±5.3	130.8±3.9**	7.90±0.3	1.7±0.1**
GST-GK(p.Ala449Thr)	13.9±0.8	19.4±1.5*	2.7±0.3	3.1±0.3

GK activity was measured in standard conditions, as described in Material and Methods, in the absence and presence of 10 μM GK activator. Since LY2121260 was dissolved in a buffer containing DMSO, all assays contained a final concentration of 0.8% DMSO. Data represent means ± SEM of at least four separate experiments from two independent enzyme purifications. Statistical significance has been estimated comparing values in the presence of LY2121260 versus their corresponding values in the presence of buffer. (**) $p < 0.005$; (*) $p = 0.023$.
doi:10.1371/journal.pone.0030518.t004

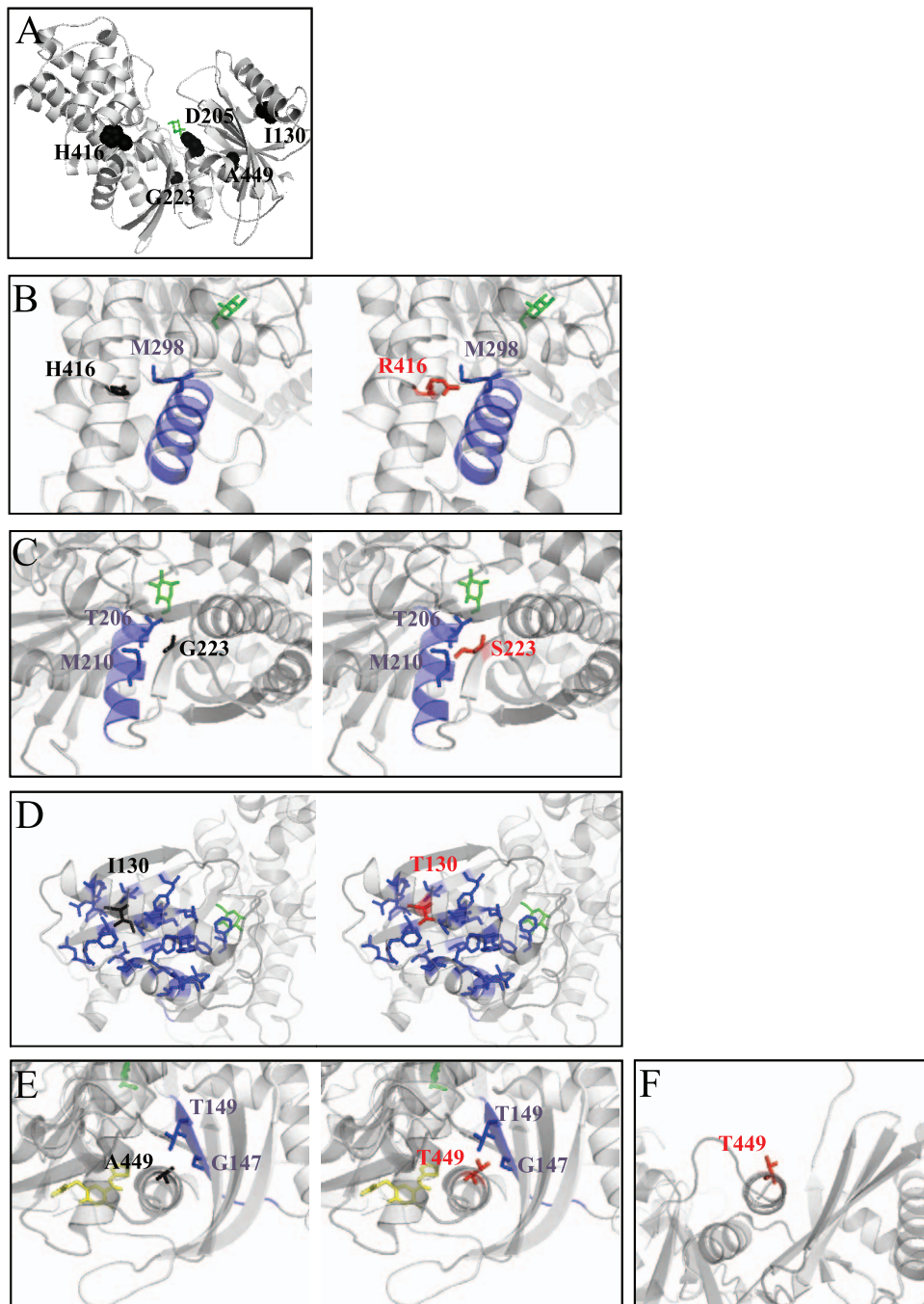


Figure 4. Localization of mutations in the structural model for beta-cell glucokinase. A) Localization of mutated residues in the closed conformation of GK. A to E) An enlargement of the region of interest is shown in each panel. F) Representation of mutation p.Ala449Thr in the super-open conformation of GK. Wild type residues are in black, whereas the mutated residues are magenta. Surrounding disturbing structures are in blue. Glucose is represented in green whereas activator compound A is in yellow. The closed (1V45) and the super-open (1V4T) conformations of GK [18] are represented using the Pymol Molecular Graphics System (Schrödinger).
doi:10.1371/journal.pone.0030518.g004

Ala449 is located in the α 13 helix which is the C-terminal region of glucokinase (Figure 4A). The α 13 helix forms part of the allosteric activator site and plays a key role in the conformational change between the active and inactive forms of glucokinase [18] [37] [38]. In contrast to other hyperglycaemia-associated GK mutations in α 13 helix, mutation p.Ala449Thr did not appear to affect global GK activity. The increase in the K_m value for ATP may not be relevant since it still remains below the intracellular

ATP concentration [19]. The reduced K_{cat} is compensated by an increased glucose affinity and loss of cooperativity for this substrate, resulting in a catalytic efficiency ($K_{cat}/S_{0.5}^h$) similar to that of the wild-type (2.44 ± 0.39 vs 2.29 ± 0.23). In the structural model of GK, the side chain of alanine or threonine at position 449 is projected to the solvent in the super-open inactive conformation (Figure 4F). In contrast, these residues are facing the β sheet of the small domain in the closed conformation

(Figure 4E). The larger and polar side chain of threonine at position 449 may alter the equilibrium between the conformational states of glucokinase. The high affinity for glucose exhibited by GST-GK(p.Ala449Thr) suggests that the closed conformation is stabilized in this mutant. This hypothesis is supported by an increase in affinity for GK inhibitor MH which binds to the catalytic site in the closed conformation of the enzyme [27]. Palmitoyl-CoA and GKRP appear to bind to distinct allosteric sites of the enzyme that could overlap in the hinge region and would act by interfering with the closure of the catalytic cleft [39] [29] [27]. Our results indicate that mutation p.Ala449Thr does not alter the interaction of GK with GKRP. However, the sensitivity to palmitoyl-CoA was increased in mutant proteins GST-GK(p.Gly223Ser) and GST-GK(p.Ala449Thr), suggesting that these mutations have some effect on the putative binding site for acyl-CoA esters in the large domain of the enzyme [29]. It has been proposed that GK activators avoid the super-open form and stabilize the open one to increase affinity for glucose and V_{max}, respectively [18]. The compound LY2121260 binds to the allosteric activator site of the enzyme and activates the enzyme in a similar fashion [38]. The fact that mutation p.Ala449Thr decreases K_{cat} and S_{0.5} to a similar extent suggests non-productive substrate binding or blockage in substrate release, which could be due to an impairment of this mutant protein to return to its open

form in order to release G6P and ADP [18]. Consistently, our results show that the compound LY2121260 had no further effect on GST-GK(p.Ala449Thr) affinity for glucose and slightly relieved the defect on catalytic constant.

In summary, the results of the biochemical analysis of these different MODY2-causing mutations illustrate the importance of the fine tuning of GK and its role in glucose sensing, and provide further insights into the role of the catalytic and allosteric activator sites in the regulation of the activity of this enzyme.

Acknowledgments

We thank Dr KJ Brocklehurst (Cardiovascular and Gastrointestinal Department, AstraZeneca, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, UK) for kindly providing the purified GKRP protein and Dr M Puig (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona) and Elli Lilly and Co, Indianapolis, IN, USA for providing the GKA activator LY2121260.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: C-MG-H OR-C OV AC-B JA M-AN. Performed the experiments: C-MG-H OR-C AG-N OV. Analyzed the data: C-MG-H OR-C OV AC-B JA M-AN. Contributed reagents/materials/analysis tools: OV AC-B JA SA AA M-AN. Wrote the paper: C-MG-H OR-C OV JA M-AN.

References

- Zelent D, Najafi H, Odili S, Buettger C, Weik-Collins H, et al. (2005) Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas. *Biochem Soc Trans* 33: 306–310.
- Matschinsky FM, Magnuson MA, Zelent D, Jetton TL, Doliba N, et al. (2006) The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 55: 1–12.
- Iynedjian PB (2009) Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci* 66: 27–42.
- Agius L (2008) Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 414: 1–18.
- Matschinsky FM (2009) Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8: 399–416.
- Van Schaftingen E, Dethoux M, Veiga da Cunha M (1994) Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *Faseb J* 8: 414–419.
- Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA (1999) Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* 274: 37125–37130.
- Slosberg ED, Desai UJ, Fanelli B, St Denny I, Connelly S, et al. (2001) Treatment of type 2 diabetes by adenoviral-mediated overexpression of the glucokinase regulatory protein. *Diabetes* 50: 1813–1820.
- Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanne-Chantelot C, et al. (2009) Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat* 30: 1512–1526.
- Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, et al. (1992) Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356: 721–722.
- Murphy R, Ellard S, Hattersley AT (2008) Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4: 200–213.
- Velho G, Blanche H, Vaxillaire M, Bellanne-Chantelot C, Pardini VC, et al. (1997) Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia* 40: 217–224.
- Pearson ER, Velho G, Clark P, Stride A, Shepherd M, et al. (2001) beta-cell genes and diabetes: quantitative and qualitative differences in the pathophysiology of hepatic nuclear factor-1alpha and glucokinase mutations. *Diabetes* 50 Suppl 1: S101–107.
- Byrne MM, Sturis J, Clement K, Vionnet N, Pueyo ME, et al. (1994) Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. *J Clin Invest* 93: 1120–1130.
- Christesen HBT, Herold KC, Noordam K, Gloyn AL (2004) Glucokinase-Linked Hypoglycemia. Clinical aspects of activating glucokinase mutations. In: FM, Magnuson MA, ed. *Glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics*. Front Diabetes Vol 16, Karger, Basel, Switzerland. pp 75–91.
- Velho GFP, Gloyn A, Hattersley (2004) Maturity Onset Diabetes of the Young Type 2. In: Matschinsky FM, Magnuson MA, eds. *Glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics*. Front Diabetes Vol 16, Karger, Basel, Switzerland. pp 42–64.
- Matschinsky FM, Zelent B, Doliba NM, Kaestner KH, Vanderkooi JM, et al. (2011) Research and development of glucokinase activators for diabetes therapy: theoretical and practical aspects. *Handb Exp Pharmacol* 203: 357–401.
- Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y (2004) Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12: 429–438.
- Davis EA, Cuesta-Munoz A, Raoul M, Buettger C, Sweet I, et al. (1999) Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and hyperglycaemia syndromes and their analysis illuminates fundamental quantitative concepts of glucose homeostasis. *Diabetologia* 42: 1175–1186.
- Garcia-Herrero CM, Galan M, Vincent O, Flandez B, Gargallo M, et al. (2007) Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia* 50: 325–333.
- Rubio-Cabezas O, Diaz Gonzalez F, Aragones A, Argente J, Campos-Barros A (2008) Permanent neonatal diabetes caused by a homozygous nonsense mutation in the glucokinase gene. *Pediatr Diabetes* 9: 245–249.
- Galan M, Vincent O, Roncero I, Azriel S, Boix-Pallares P, et al. (2006) Effects of novel maturity-onset diabetes of the young (MODY)-associated mutations on glucokinase activity and protein stability. *Biochem J* 393: 389–396.
- Dixon M (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 55: 170–171.
- Brocklehurst KJ, Payne VA, Davies RA, Carroll D, Vertigan HL, et al. (2004) Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators. *Diabetes* 53: 535–541.
- Brocklehurst KJ, Davies RA, Agius L (2004) Differences in regulatory properties between human and rat glucokinase regulatory protein. *Biochem J* 378: 693–697.
- Borowiec M, Mysliwiec M, Fendler W, Antosik K, Brandt A, et al. (2011) Phenotype variability and neonatal diabetes in a large family with heterozygous mutation of the glucokinase gene. *Acta Diabetol* 48: 203–208.
- Moukil MA, Veiga-da-Cunha M, Van Schaftingen E (2000) Study of the regulatory properties of glucokinase by site-directed mutagenesis: conversion of glucokinase to an enzyme with high affinity for glucose. *Diabetes* 49: 195–201.
- Xu LZ, Zhang W, Weber IT, Harrison RW, Pilks SJ (1994) Site-directed mutagenesis studies on the determinants of sugar specificity and cooperative behavior of human beta-cell glucokinase. *J Biol Chem* 269: 27458–27465.
- Veiga-da-Cunha M, Xu LZ, Lee YH, Marotta D, Pilks SJ, et al. (1996) Effect of mutations on the sensitivity of human beta-cell glucokinase to liver regulatory protein. *Diabetologia* 39: 1173–1179.
- Heredia VV, Carlson TJ, Garcia E, Sun S (2006) Biochemical basis of glucokinase activation and the regulation by glucokinase regulatory protein in naturally occurring mutations. *J Biol Chem* 281: 40201–40207.
- Mahalingam B, Cuesta-Munoz A, Davis EA, Matschinsky FM, Harrison RW, et al. (1999) Structural model of human glucokinase in complex with glucose and ATP: implications for the mutants that cause hypo- and hyperglycemia. *Diabetes* 48: 1698–1705.

32. Marotta DE, Anand GR, Anderson TA, Miller SP, Okar DA, et al. (2005) Identification and characterization of the ATP-binding site in human pancreatic glucokinase. *Arch Biochem Biophys* 436: 23–31.
33. Molnes J, Teigen K, Aukrust I, Bjorkhaug L, Sovik O, et al. (2011) Binding of ATP at the active site of human pancreatic glucokinase - nucleotide-induced conformational changes with possible implications for its kinetic cooperativity. *Febs J* 278: 2372–2386.
34. Gloyn AL, Odili S, Buettger C, Njolstad PR, Shiota C, et al. (2004) Glucokinase and the regulation of blood sugar. A mathematical model predicts the threshold for glucose stimulated insulin release for GCK gene mutations that cause hyper- and hypoglycemia. In: Matschinsky FM, Magnuson MA, eds. *Glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics*, Front Diabetes Vol 16, Karger, Basel, Switzerland. pp 92–109.
35. Sagen JV, Odili S, Bjorkhaug L, Zelent D, Buettger C, et al. (2006) From clinicogenetic studies of maturity-onset diabetes of the young to unraveling complex mechanisms of glucokinase regulation. *Diabetes* 55: 1713–1722.
36. Takeda J, Gidh-Jain M, Xu LZ, Froguel P, Velho G, et al. (1993) Structure/function studies of human beta-cell glucokinase. Enzymatic properties of a sequence polymorphism, mutations associated with diabetes, and other site-directed mutants. *J Biol Chem* 268: 15200–15204.
37. Dunten P, Swain A, Kammlott U, Crowther R, Lukacs CM, et al. (2004) Crystal Structure of Human Liver Glucokinase Bound to a Small Molecule Allosteric Activator. In: Matschinsky FM, Magnuson MA, eds. *Glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics*, Front Diabetes Vol 16, Karger, Basel, Switzerland. pp 145–154.
38. Efanov AM, Barrett DG, Brenner MB, Briggs SL, Delaunoy A, et al. (2005) A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function. *Endocrinology* 146: 3696–3701.
39. Tippet PS, Neet KE (1982) An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A. *J Biol Chem* 257: 12846–12852.

Glucokinase (GCK) Mutations and Their Characterization in MODY2 Children of Southern Italy

Marina Capuano^{1,2*}, Carmen Maria Garcia-Herrero^{3,4*}, Nadia Tinto^{1,2}, Carla Carluccio^{2,5}, Valentina Capobianco⁶, Iolanda Coto^{1,2}, Arturo Cola^{1,2}, Dario Iafusco⁷, Adriana Franzese⁸, Adriana Zagari^{2,5}, Maria Angeles Navas^{3,4}, Lucia Sacchetti^{1,2*}

1 Department of Biochemistry and Medical Biotechnology, University of Naples "Federico II", Naples, Italy, **2** Centro di Ingegneria Genetica (CEINGE) Advanced Biotechnology, s. c. a. r. l., Naples, Italy, **3** Department of Biochemistry and Molecular Biology III, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, **4** Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona, Spain, **5** Department of Biological Science, University of Naples "Federico II", Naples, Italy, **6** Fondazione SDN-IRCSS (Istituto di Diagnostica Nucleare-Istituto di Ricerca e Cura a Carattere Scientifico), Naples, Italy, **7** Department of Pediatrics, Second University of Naples, Naples, Italy, **8** Department of Pediatrics, University of Naples "Federico II", Naples, Italy

Abstract

Type 2 Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY2) is a monogenic autosomal disease characterized by a primary defect in insulin secretion and hyperglycemia. It results from GCK gene mutations that impair enzyme activity. Between 2006 and 2010, we investigated GCK mutations in 66 diabetic children from southern Italy with suspected MODY2. Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) and sequence analysis revealed 19 GCK mutations in 28 children, six of which were novel: p.Glu40Asp, p.Val154Leu, p.Arg447Glyfs, p.Lys458_Cys461del, p.Glu395_Arg397del and c.580-2A>T. We evaluated the effect of these 19 mutations using bioinformatic tools such as Polymorphism Phenotyping (PolyPhen), Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) and *in silico* modelling. We also conducted a functional study to evaluate the pathogenic significance of seven mutations that are among the most severe mutations found in our population, and have never been characterized: p.Glu70Asp, p.His137Asp, p.Phe150Tyr, p.Val154Leu, p.Gly162Asp, p.Arg303Trp and p.Arg392Ser. These seven mutations, by altering one or more kinetic parameters, reduced enzyme catalytic activity by >40%. All mutations except p.Glu70Asp displayed thermal-instability, indeed >50% of enzyme activity was lost at 50°C/30 min. Thus, these seven mutations play a pathogenic role in MODY2 insurgence. In conclusion, this report revealed six novel GCK mutations and sheds some light on the structure-function relationship of human GCK mutations and MODY2.

Citation: Capuano M, Garcia-Herrero CM, Tinto N, Carluccio C, Capobianco V, et al. (2012) Glucokinase (GCK) Mutations and Their Characterization in MODY2 Children of Southern Italy. PLoS ONE 7(6): e38906. doi:10.1371/journal.pone.0038906

Editor: Pal Bela Szecsi, Lund University Hospital, Sweden

Received: March 12, 2012; **Accepted:** May 14, 2012; **Published:** June 20, 2012

Copyright: © 2012 Capuano et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Work was supported by grants from: CEINGE-Regione Campania, Italy (DGRC 1901/2009), the Instituto de Salud Carlos III, Spain (PI1000424) and the Dirección General de Universidades e investigación de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid-Universidad Complutense de Madrid, Spain (CCG10-UCM/BIO-4728). C.M. García-Herrero was supported by a predoctoral FPU fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sacchetti@unina.it

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY), a monogenic diabetes inherited in an autosomal dominant mode, accounts for 1–2% of all diabetes forms in Europe [1,2]. It is a clinically heterogeneous group of diseases caused by at least eight gene defects in the pancreatic β -cell that impair insulin secretion [3]. MODY is characterized by onset before 25 years of age; patients usually lack auto-antibodies, and clinical manifestations go from slight non-ketotic hyperglycemia to severe complicated hyperglycemia [4]. Heterozygous mutations in the *glucokinase* (*GCK*) gene produce two distinct diseases, MODY type 2 (MODY2) (MIM:125851) and persistent hyperinsulinemia of infancy (MIM:601820) [5,6]. Persistent hyperinsulinemia of infancy is associated with hyperactive GCK variants, while MODY2 is associated with GCK mutations that impair its activity [7]. GCK (hexokinase IV) catalyzes the ATP-dependent phosphorylation of glucose in the first, rate-limiting step of glycolysis in pancreatic β -

cells [1]. The crystal structure determination of the enzyme by Kamata et al. [8] revealed that the enzyme exists in at least two distinct forms, the super-open ligand-free form and the closed active form that is bound to glucose and ATP. The molecule consists of two domains, namely a small and large domain separated by the glucose site. In detail, amino acid residues 1–64 and 206–439 belong to the large domain, amino acid residues 72–201 and 445–465 to the small domain, and amino acid residues 65–71, 202–205 and 440–444 to the three loops connecting the domains [8]. The GCK protein switches from an inactive conformation to a close active conformation upon ligand binding. A huge conformational transition occurs through a large rotation of the small domain [8].

The heterozygous loss-of-function GCK mutations causative of MODY2 diabetes include missense, nonsense, splicing, small deletions/insertions/duplications variants, and result in stable fasting hyperglycemia from birth (>5.5 mol/L) and rare micro-vascular complications [1]. Over 644 GCK mutations have been

described, and a study of the mutational mechanisms for a number of these has shed light on GCK regulation [9].

The molecular diagnosis of MODY2 is important: to classify the type of diabetes correctly, to predict prognosis, and to initiate screening of family members [1]. It is particularly important to identify MODY2 in diabetic pregnant patients in order to start “ad hoc” treatment [10]. However, the identification of *GCK* mutations by molecular analysis will not always reveal whether a variant is really pathogenic or how serious the diabetic phenotype could be. Therefore, in this five-year study, we applied an integrated approach to investigate the effect of *GCK* mutations in the diabetic phenotype in children from southern Italy. First, we used DHPLC and mutation sequencing to identify variants, then a computational approach to predict the effect of the variants identified, and finally a functional study to determine the effect of seven candidate variants on enzyme activity and on enzyme thermo-stability.

Results

Among the 66 enrolled patients with suspected MODY2, 28/66 were diagnosed as MODY2 based on mutations in the *GCK* gene (MODY2+) and 38/66 were MODY2-negative (MODY2−). All mutated patients were unrelated, except two pairs of siblings (patient identification: MD19/20: two sisters and MD69/70: brother/sister). The mean age at diagnosis (\pm Standard Deviation: SD) was lower, albeit not significantly, in MODY2+ than in MODY2− patients (105 ± 45 months vs 113 ± 45 months). Mean triglyceride levels did not differ between the two groups (0.6 ± 0.2 and 0.7 ± 0.3 mmol/L, respectively). Mean Fasting Plasma Glucose (FPG) and glycosylated hemoglobin (HbA1c) concentrations were significantly higher ($p < 0.003$ and $p < 0.001$, respectively) in MODY2+ than in MODY2− patients (6.7 ± 0.8 mmol/L and $6.2 \pm 0.3\%$ vs 6.1 ± 0.7 mmol/L and $5.5 \pm 0.5\%$, respectively). The Body Mass Index zeta-score (BMIz-score) of enrolled children at first admission was always in the reference range for the children's age (reference range: $-1.5/+1.5$), except in one patient (BMIz-score: 2.5). Two/28 MODY2+ patients were positive for only one type-1 diabetes auto antibody (glutamate decarboxylase: 8 and 18 U/mL). The patients were untreated until diagnosis.

Identification of *GCK* Mutations

We identified 19 different *GCK* mutations in 28/66 patients (Table 1). Six of them were novel: two missense mutations (p.Val154Leu and p.Glu40Asp), one splice site variant (c.580-2A>T) and three deletions (p.Lys458_Cys461del, p.Arg447Glyfs, and p.Glu395_Arg397del). We also found 13 previously reported mutations: 11 missense mutations (p.Arg303Trp, p.Gly261Arg, p.Phe150Tyr, p.Ala259Thr, p.Glu70Asp, p.Lys420Glu, p.Ala188Thr, p.Tyr289Cys, p.Asp278Glu, p.Gly223Ser, and p.Ala449Thr) and two splice site variants (c.864-1G>A and c.1019+5G>A). All the detected mutations were always present in the children's mother or father and were absent from 200 chromosomes of our euglycemic controls. Seven mutations were each present in two unrelated families: p.Arg303Trp, p.Lys458_Cys461del, p.Arg447Glyfs, p.Gly261Arg, p.Phe150Tyr, p.Lys420Glu and p.Ala259Thr, the latter was also identified in two siblings. Table 1 shows, for each mutation (except the three splice variants c.864-1G>A, c.580-2A>T and c.1019+5G>A, the frameshift mutation p.Arg447Glyfs and the p.Lys458_Cys461del), the nucleotide position, the amino acid change (if present), the effect on the protein predicted by bioinformatics.

Bioinformatics Study of the *GCK* Variants

All substitutions, except p.Val154Leu and p.Glu40Asp, were predicted to be deleterious mutations by online prediction tools (Table 1, column 4). Overall, the theoretical structural models of the mutants we obtained *in silico* (Table 1, column 5), preserve the overall protein fold. In detail, however, all mutations produced local conformational alterations – in some cases, such as p.Gly162Asp, dramatic perturbations – that well account for the functional alterations we found (Table 2). **p.Arg303Trp**-Arg303 is a highly conserved residue located in the $\alpha 8$ helix within the large domain. Mutation p.Arg303Trp disrupts two salt-bridges between the side chain of Arg303 and the side chain of Glu300, located in the same helix. These salt-bridges may be essential for the stability of the helix and their loss could destabilize the helix structure. **p.Val154Leu**-The p.Val154Leu mutation (Figure 1) does not cause any significant change in the local structure. Indeed, Val154 is located in the β -sheet that encompasses the small domain hydrophobic core. Its substitution with a leucine residue does not affect the hydrophobic interactions. Nevertheless, Val154 is involved in the large conformational variation from the super-open to close form upon glucose binding (Figure 1A). **p.Gly261Arg**-Gly261 is located in the loop connecting the β -sheet and the $\alpha 6$ helix in the large domain. p.Gly261Arg is a dramatic mutation because the small, flexible hydrophobic Gly residue is replaced by a very large Arg residue that bears a positive net charge. This substitution causes a local re-arrangement that involves the nearby residues such as Leu266 and Leu270. This process results in destabilization of the local structure.

p.Phe150Tyr-Phe150 is a highly conserved residue located in the β -sheet that encompasses the small domain hydrophobic core. The p.Phe150Tyr mutation (Figure 1B, C) introduces a polar residue inside the hydrophobic core in a region rich in phenylalanine. This replacement can influence the stability of the β -sheet thereby altering the structure of the domain. **p.Ala259Thr**-Ala259 residue is located in the large domain near the glucose-binding cleft. Introduction of a larger and polar side chain of threonine in the p.Ala259Thr mutant could influence the hydrogen bond network in that area. In fact, Thr259 can compete with other residues in the formation of hydrogen bonds with two water molecules. See our previous study for a description of the **p.Glu70Asp** variant [11]. **p.Lys420Glu**-Mutation p.Lys420Glu involves an inversion from a positively charged lysine to a negatively charged glutamic acid. The substitution affects the interaction of Lys420 with surrounding residues. Indeed, Lys420 is located in the $\alpha 12$ helix (Figure S1) in the large domain and forms a salt bridge with Glu440 located in a connecting loop between the two domains. The loss of this bond, caused by the mutation, could destabilize the region. **p.Ala188Thr**-The p.Ala188Thr mutation alters a highly conserved amino acid. Ala188 is located in the $\alpha 4$ helix within the small domain. The mutation leads to the substitution of a hydrophobic residue, alanine, with a polar residue, tyrosine, on the hydrophobic side of an amphipathic helix. Thr188 can form hydrogen bonds through the hydroxyl group with the side chains of the Ser127 and Asp124 residues on the $\alpha 3$ helix that is on the surface of the enzyme. The introduction of the threonine can cause a different arrangement of such side chain. **p.Tyr289Cys**-Tyr289 is located in the $\alpha 7$ helix in the large domain. The substitution of the bulk tyrosine in position 289 with the smaller cysteine side chain leads to the formation of a cavity. The mutant disrupts a favorable interaction between Tyr289 and Met381 of the $\alpha 11$ helix that may be important to keep helices together. It is noteworthy that, in our model, Cys289 is not bound to the nearby Cys230 because the distance (4.1 Å) between the two sulfur atoms too long for a disulfide bond formation. **p.As-**

Table 1. GCK mutations detected in MODY2 children from South Italy.

Patient code	GCK Exon ^a	cDNA mutation ^b	Polyphen/SIFT prediction ^c	Aminoacid change ^d /Domain localization/Secondary structure	Effect on protein 3D-structure	Reference
MD01/92	8	c.907C>T	1/deleterious	p.Arg303Trp/Large domain/ α 8 helix	Disruption of two salt-bridges	[25]
MD05/71	10	c.1373_1385del		p.Lys458_Cys461del/Small domain/ α 13 helix		NOVEL
MD10	4	c.460G>T	2/tolerated	p.Val154Leu/Small domain/ β -strand 6	Severe perturbation during the transition from the super-open to closed form. Mild local structural alteration	NOVEL
MD12/89	10	c.1339delC		p.Arg447Glyfs/Small domain/ α 13 helix		NOVEL
MD16/75	7	c.781G>T	1/deleterious	p.Gly261Arg/Large domain/loop	Replacement of a small and flexible hydrophobic residue with a large positive residue	[26]
MD18/94	4	c.449T>A	1/deleterious	p.Phe150Tyr/Small domain/ β -strand 5	Introduction of a polar residue in the hydrophobic core. Perturbation of the β -sheet	[27]
MD19 ^e /20 ^e /79	7	c.775G>A	3/deleterious	p.Ala259Thr/Large domain/loop	Influence on the hydrogen bond network near the glucose-binding cleft	[28]
MD25	2	c.210A>C	1/deleterious	p.Glu70Asp/Connection/Loop spatially near α 13 helix	Weakness of salt bridge interaction with K458 (α 13 helix)	[11]
MD26/65	10	c.1258A>G	2/deleterious	p.Lys420Glu/Large domain/ α 12 helix	Loss of a salt bridge between K420 and E440	[29]
MD38	Intron 7	c.864-1G>A		IVS7-1G>A		[9]
MD57	5	c.562G>A	1/deleterious	p.Ala188Thr/Small domain/ α 4 helix	Substitution of a hydrophobic residue with a polar residue	[30]
MD59	8	c.866A>G	1/deleterious	p.Tyr289Cys/Large domain/ α 7 helix	Disruption of a favorable interaction between Y289 and M381	[9]
MD68	7	c.834G>A	1/deleterious	p.Asp278Glu/Large domain/ α 6 helix	Mild structural alteration	[9]
MD69 ^e /70 ^e	Intron 5	c.580-2A>T		IVS5-2A>T		NOVEL
MD80	6	c.667G>A	3/deleterious	p.Gly223Ser/Large domain/ β -strand 9	Perturbation of the β -strand	[31]
MD86	Intron 8	c.1019+5G>A		IVS8+5G>A		[27]
MD90	2	c.120G>C	2/tolerated	p.Glu40Asp/Large domain/ α 2 helix	Mild structural alteration	NOVEL
MD91	10	c.1345G>C	3/deleterious	p.Ala449Thr/Small domain in the closed form/ α 13 helix	Introduction of a larger and polar side chain	[9]
MD95	9	c.1182_1191del		p.Glu395_Arg397del/Large domain/last residue of α 11 helix and following loop	Destabilization of the C-terminal region of the helix and shortening of loop	NOVEL

^aGenBank: accession number (AH005826). ^bThe reference cDNA sequence was obtained from GenBank (NM_000162) and +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon. ^cPolyphen prediction: probably damaging (1), benign (2), possibly damaging (3). SIFT score: <0.05 deleterious variant, \geq 0.05 tolerated variant.

^dSwissprot accession number: P35557. ^eSibling pairs (MD19/20: two sisters; MD69/70: brother/sister).

doi:10.1371/journal.pone.0038906.t001

p278Glu—The p.Asp278Glu mutation affects a highly conserved amino acid. Asp278 is located on the polar side of the α 6 helix in the large domain. The replacement of Asp with a Glu residue in the mutant does not seem to cause significant changes in the enzyme structure. **p.Gly223Ser**—Gly223 is a highly conserved residue located in the β -sheet of the large domain hydrophobic core. The substitution with a serine involves the serine side-chain hydrogen bonding to Cys 233, close to Gly223 in the structure of GCK and could perturb the β -strand. **p.Glu40Asp**—The p.Glu40Asp mutation substitutes a conserved glutamate residue with aspartate. Glu40 is located on the polar side of the α 2 helix in the large domain. These amino acids are acidic residues but the side chain of the aspartate is shorter than the side chain of the glutamate. Nevertheless, the mutation does not seem to cause significant changes in the structure of the enzyme. **p.Ala449Thr**—Ala449 is a highly conserved residue located on the C-terminal α 13 helix. This helix is part of the small domain in the closed form,

but it lies between the two domains in the super-open form. In the closed form, the small domain has a three-layer architecture and the α 13 helix is in the inner layer. At the domain interface, the α 13 helix makes favorable interactions with the α 5 helix of the large domain. Because the conformational features of this region are essential for the super-open (inactive form)/closed (active form) conversion, the introduction of a larger and polar side chain of the threonine in the p.Ala449Thr mutant could influence the enzymatic activity and/or stability. **p.Glu395_Arg397del**—The p.Glu395_Arg397 deletion causes the elimination of the last residue, Glu395, of the α 11 helix in the large domain and two residues of the following loop, Ser396 and Arg397. In the wild-type enzyme, Glu395 is involved, through the backbone N atom, in the formation of a hydrogen bond of the α 11 helix. Its deletion in the mutant causes the lack of this bond and could destabilize the C-terminal region of the helix. Moreover, also the backbone N atom of Arg397 interacts with an oxygen atom of Arg394 thereby

Table 2. Kinetic constants of human recombinant wild type-GCK and mutant β -cell GST-GCK fusion proteins.

Preparation	Protein yield (mg/L of culture)	Kcat (s^{-1})	S _{0.5} for glucose (mmol/L)	nH	Km for ATP (mmol/L)	I _a
Wild-type GST-GCK	3.12±0.91	44.10±7.50	7.20±0.40	1.40±0.08	0.40±0.00	1.0±0.07
GST-GCK(Glu70Asp)	2.35±0.55	27.40±4.80*	20.10±3.20†	1.20±0.07	0.25±0.05	0.25±0.06**
GST-GCK(His137Asp)	2.82±0.47	17.20±1.20**	18.10±3.10*	1.10±0.03**	0.23±0.03*	0.26±0.09**
GST-GCK(Phe150Tyr)	3.07±0.55	9.92±2.38*	101.40±6.20**	1.06±0.05*	3.11±0.48*	0.014±0.003*
GST-GCK(Val154Leu)	2.77±0.48	46.60±4.40	26.00±3.40*	1.54±0.01	1.62±0.16*	0.099±0.036**
GST-GCK(Gly162Asp)	2.78±0.58	Undetectable activity				
GST-GCK(Arg303Trp)	1.58±0.26	14.60±1.38**	4.62±0.10**	1.52±0.02	0.29±0.01*	0.59±0.09*
GST-GCK(Arg392Ser)	2.44±0.74	41.30±11.30	11.90±1.70*	1.30±0.03	0.63±0.03*	0.60±0.25

Data represent means \pm SEM of 3 separate enzyme expressions each tested in duplicate. Note that the Hill coefficient (nH) and the relative activity index (I_a) are unit less. Kcat: GCK catalytic constant; S_{0.5}: affinity constant for glucose; nH: Hill coefficient; Km for ATP: affinity constant for ATP; I_a: GCK activity index. (*) $p < 0.05$, t test; (**) $p < 0.005$, t test.

doi:10.1371/journal.pone.0038906.t002

stabilizing the helix. In the mutant, the loop becomes shorter and the side chain of Arg394, which in the wild-type enzyme is directed towards the loop, changes the orientation because of steric interactions. This change disrupts interactions between the side chain of Arg394 and some residues of the loop. Although the interaction between the side chains of Arg394 and Ser433 in the loop following the α 12 helix is conserved, the binding appears to be weakened compared with the wild-type enzyme.

Kinetic Analysis and Thermo-stability of Recombinant GCK Mutants

To select representative mutations for a functional study to evaluate their pathogenic significance, we considered all the mutations found in our population in the last decade (11 and present work) in terms of severity and location. All the selected mutations were mapped in the whole GCK structure: p.His137Asp, p.Phe150Tyr, p.Val154Leu, p.Gly162Asp, in the small domain, Arg303Trp and p.Arg392Ser, in the large domain and p.Glu70Asp in a loop connecting the two domains. Three among these mutations, (p.Gly162Asp, p.His137Asp and p.Arg392Ser) were the most severe and none have been produced or characterized. Figure 2 shows the position of selected mutated residues in the structure model of the GCK enzyme. All variants displayed reduced enzyme activity versus the wild-type GST-GCK, as shown by the I_a index. The kinetic characteristics of GST-GCK-wt and GST-GCK-mutants, determined *in vitro* enzymatic assays, are shown in Table 2. Mutations p.Gly162Asp, p.Phe150Tyr and p.Val154Leu, localized in the core of the molecule, not far from the substrate binding site, produced the strongest effect. The p.Gly162Asp change is very deleterious since no enzymatic activity was detected in the mutant protein, and mutations p.Phe150Tyr and p.Val154Leu reduced enzyme activity to below 10% of the wild-type enzyme. In contrast, mutations p.Glu70Asp, p.His137Asp, p.Arg303Trp and p.Arg392Ser, localized in more peripheral positions, retained at least 25% of wild-type activity. We also evaluated the protein stability of wild-type and of mutant GST-GCK and the time-course of thermal inactivation at different temperatures (Figure 3A and B respectively). Wild-type GCK activity remained practically constant under temperatures up to 50°C, but fell abruptly at 55°C. In contrast, the enzyme activity of all mutants, except GST-GCK (p.Glu70Asp), rapidly decreased by more than 50% at 50°C (Figure 3A). The time-course analysis of GCK thermal inactivation indicated that the mutants rendered the enzyme thermo-

unstable (more than 50% of GCK activity was lost within 30 min at 50°C), whereas 50% of wild-type GCK activity was present after 30 min of incubation at the critical temperature (Figure 3B).

Discussion

A correct diagnostic approach to the MODY2 patient is important to avoid useless, expensive analyses and misclassification of the diabetes. In this study, we characterized the GCK gene by DHPLC followed by sequence analysis in 66 patients with suspected MODY2 enrolled between 2006 and 2010. We identified 19 GCK mutations in 28 children accounting for 42.4% of suspected MODY2 children. Our data are similar to those we obtained between 2001 and 2005 [11] and are also in agreement with the high prevalence of MODY2 (up to 61% of MODY forms) found in Italy and in southern Europe [12,13]. Among the 19 GCK variants described herein, six are new (p.Lys458_Cys461del, p.Val154Leu, p.Arg447Glyfs, IVS5-2A>T, p.Glu40Asp and p.Glu395_Arg397del) and 13 previously reported. Glucokinase missense mutations are the most frequent causes of MODY2 [9]. In our study, the missense mutations (13/19: two new and 11 known), and deletions (n = 3) were distributed throughout the protein: six/16 (38%) in the small domain, nine/16 (56%) in the large domain and one/16 (6%) in the connecting region of the protein. These findings are in agreement with a study in which no hot spot mutations were reported [9].

In the attempt to understand how the detected mutations could contribute to MODY2 insurgence, we searched for structure/function correlations of the disease-causing mutated proteins. First, we evaluated the impact of each mutation (except splice variants and deletions) on the enzyme 3D-structure and then, for seven selected mutations, we carried out functional studies. All the mutations considered here are buried in the enzyme, except for p.Glu70Asp that is located on the surface of the protein, and all mutations are far from the active and ATP binding sites (Table 1). Apart from p.Val154Leu and p.Phe150Tyr that undergo large movements during the conformational transition from the super-open to the closed active form, all the mutant structures exhibit local structural alterations (Table 1) that well correlate to kinetic parameters and thermal inactivation data (Table 2, Figure 3). In all cases, the amino-acid replacement either provokes the loss of stabilizing interactions or generates unfavorable interactions that may destabilize the enzyme.

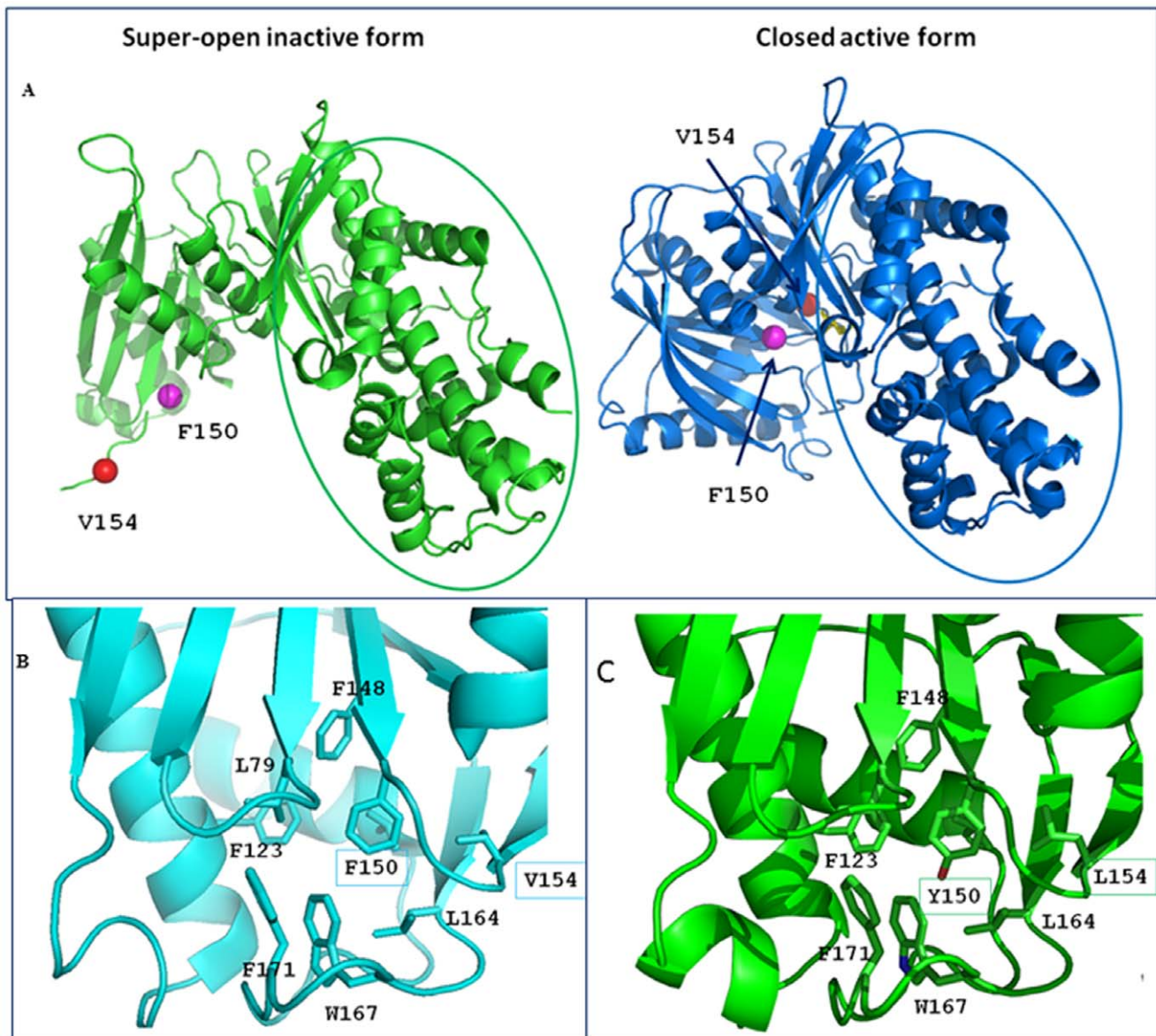


Figure 1. View of the mutations p.Phe150Tyr and p.Val154Leu in the whole structures and in their local environment. **A:** The structures of GCK in the super-open inactive form (PDB code code: 1v4t) and in the closed active form (PDB code code: 1v4s) are shown on the left and on the right, respectively. In the closed form (right) the sugar is shown as a yellow stick. In both panels, the large domain is in the same orientation and is circled. It is clear that the small domain undergoes a large conformational variation from the super-open to the closed form. Specifically the region embodying the residues Phe150 (blue sphere) and Val154 (red sphere) dramatically changes its orientation. **B:** Close-up view of the wild-type closed structure showing the hydrophobic core rich in aromatic/hydrophobic amino acids. Leu79, Phe123, Phe148, Phe150, Val154, Leu164, Trp167 and Phe171 form an intricate network of stabilizing hydrophobic interactions. **C:** Structure of GCK closed structure containing both the Tyr150 and Leu154 mutated residues. Introduction of the oxydryl group (red) of Tyr150 within the hydrophobic core disrupts the interactions present in the wt-enzyme. The replacement of Val154 by leucine produces only small changes in the closed form. doi:10.1371/journal.pone.0038906.g001

We evaluated the effects on GCK kinetics and thermo-stability of seven GCK variants distributed in different functional domains of the enzyme: three variants described in the present study (p.Phe150Tyr, p.Val154Leu, p.Arg303Trp) and four (p.Glu70Asp, p.His137Asp, p.Gly162Asp and p.Arg392Ser) previously reported [11]. The GST-GCK (p.Glu70Asp) mutant showed a GCK activity index significantly lower than the wild type (mean $I_a = 0.25$). This effect is due to discrete defects in the kinetic constants, in particular, glucose affinity was significantly reduced ($S_{0.5}$ for glucose: 20.1 ± 3.2 vs 7.2 ± 0.4 mM). Variant p.Glu70Lys displayed a similarly decreased activity index (mean

$I_a = 0.31$) without significant thermo-instability [14,15]. The substitution of histidine with aspartic acid (p.His137Asp) affected GCK function (mean $I_a = 0.26$). As shown by molecular modelling, this mutation introduces a negative charge in the region that may affect the charge distribution of the protein [11]. The previously reported mutation p.His137Arg, in which His is replaced by the positively charged arginine, did not affect enzyme activity (mean $I_a = 0.92$) [15]. This finding shows that a negatively charged amino acid is not tolerated at this site. p.Phe150Tyr and the novel p.Val154Leu mutations dramatically reduced GCK activity (mean $I_a = 0.014$ and 0.099 , respectively)

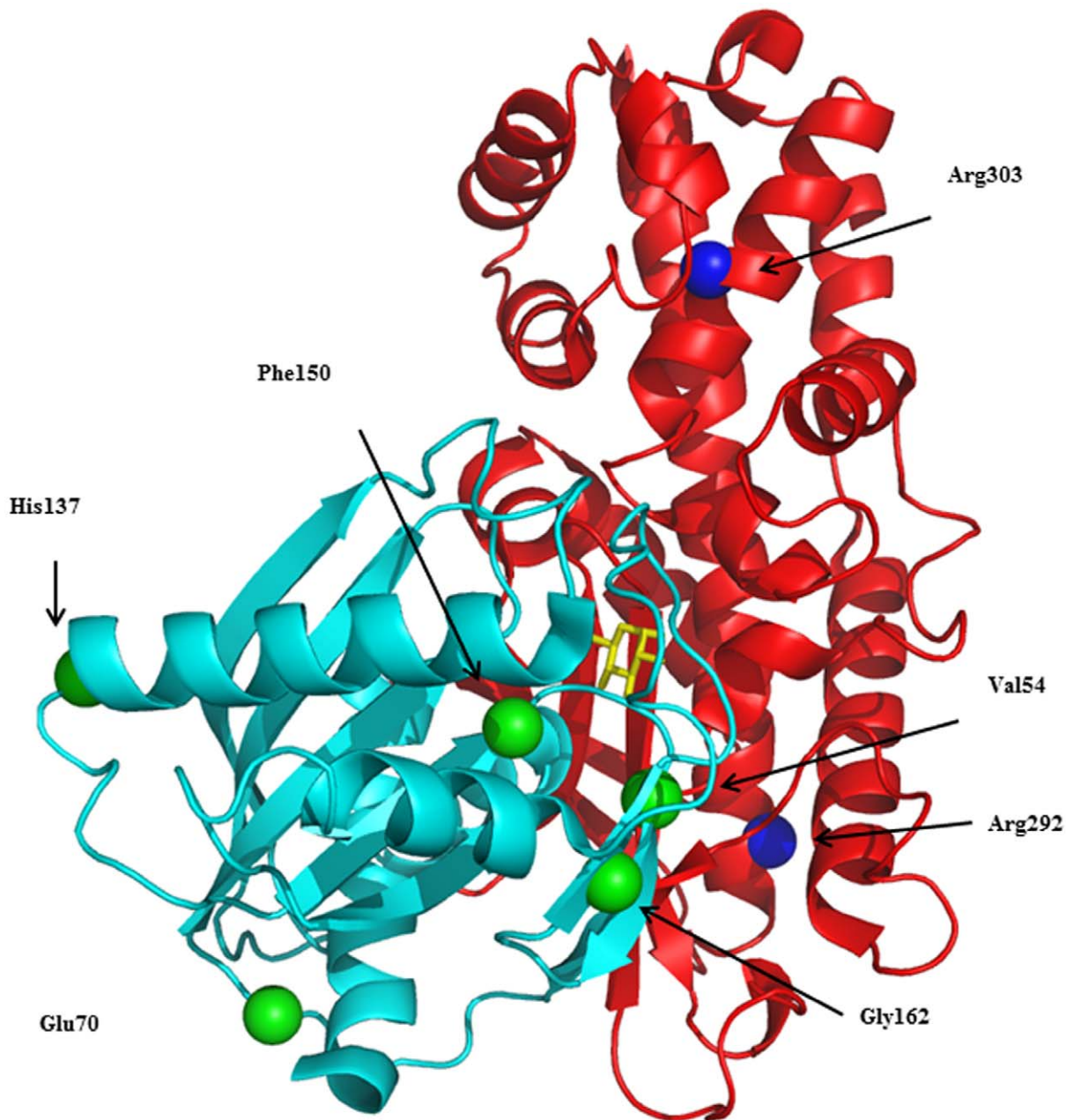


Figure 2. Distribution of the selected GCK mutations. The structure of GCK in the active closed form is shown (PDB code: 1v4s); the small and large domains are drawn in cyan and red, respectively; glucose appears as a yellow stick. Mutation sites are shown as green or blue spheres.
doi:10.1371/journal.pone.0038906.g002

and thermo-stability (<40% at 50°C/30 min than in wild-type). Both mutations displayed high $S_{0.5}$ and ATP K_m values, which indicate a greatly reduced affinity for glucose and ATP. In particular, the cooperativity of p.Phe150Tyr was significantly reduced ($nH = 1.06$ vs 1.40 , t test, $p = 0.038$). It is noteworthy that Val154 is one of residues that undergo large movements during the transition from the super-open to the closed form. Even though the replacement of Val by Leu provokes only small local perturbations, the latter may be relevant during the conformational transition induced by ATP and glucose binding. The substitution of glycine 162 by aspartic acid (p.Gly162Asp) affected the hydrophobic core of the enzyme and, as predicted by molecular modelling [11], markedly alters the structure and

dynamics of the domain. This is one of the most dramatic mutations we identified as it introduces a net negative charge into a hydrophobic environment [11]. In fact, the enzyme activity of this mutant was undetectable. Although any reduction in the I_a below 30% of the wild type would have little further effect on the fasting plasma glucose [15], it is noteworthy that fasting glycemia was higher in the child with this mutation (10.0 mmol/L) [11] than in other MODY2 children (mean 6.7 ± 0.8 mmol/L). Arg 303 is located in the $\alpha 8$ helix and molecular modelling indicates that the Arg-to-Trp change at this position would destabilize the helix structure. Mutation p.Arg303Trp caused a reduction of the activity index (mean $I_a = 0.59$), mainly due to a decrease in the catalytic constant, being

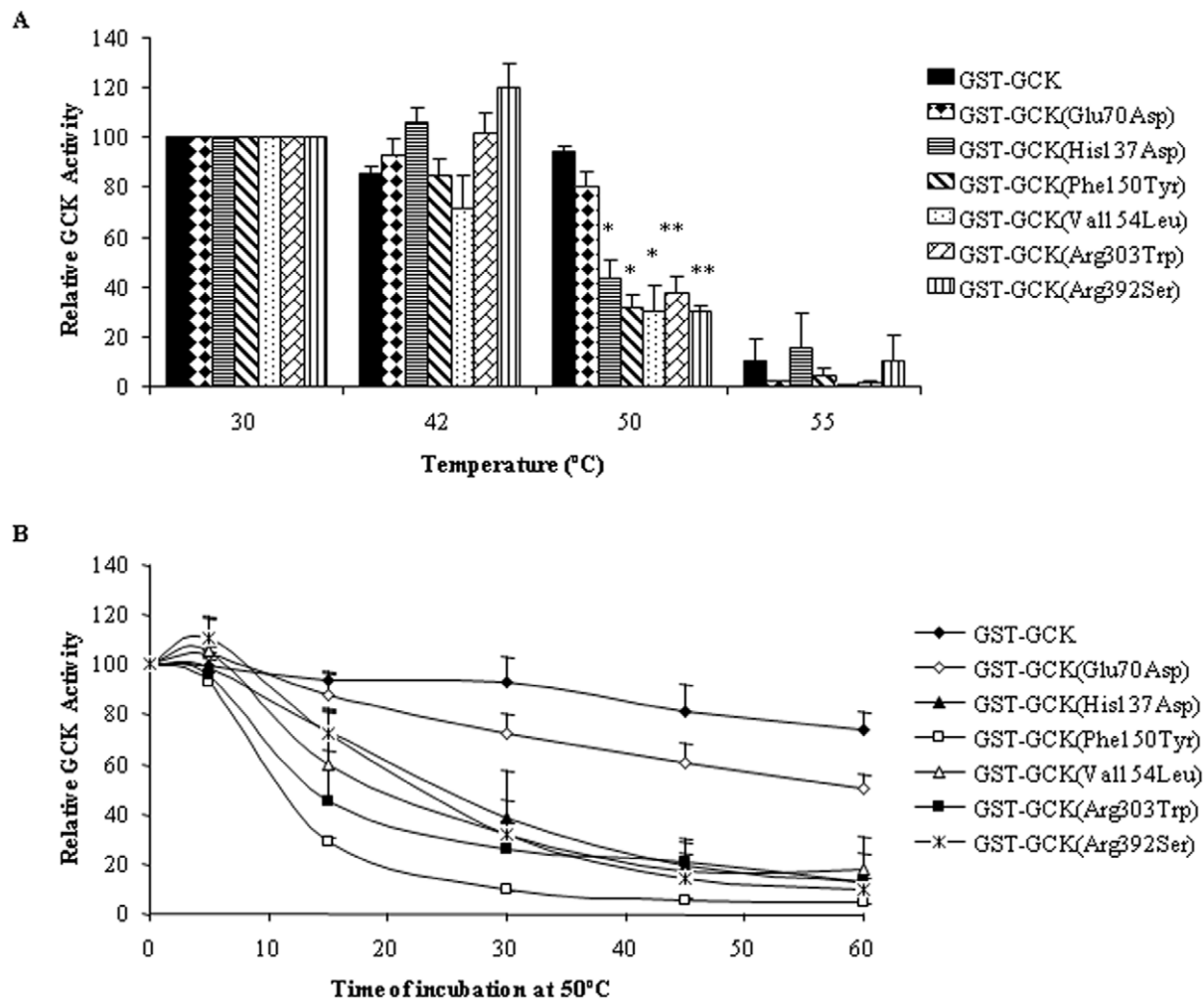


Figure 3. Effect of temperature on the stability of GST-GCK mutants. Stock enzyme solutions were diluted to 250 μ g/ml in storage buffer containing 30% glycerol, 50 mM glucose, 10 mM glutathione, 5 mM DTT, 200 mM KCl and 50 mM Tris/HCl, pH 8.0. Panel A: The enzyme solutions were incubated for 30 min at temperatures ranging from 30 to 55°C and then assayed at 30°C as described in the Methods section. Panel B: The enzyme solutions were incubated for periods of time from 5 to 60 min at 50°C. Results are means and SEM of three independent enzyme preparations for each mutant except for GST-GCK (Phe150Tyr) which corresponds to two independent enzyme preparations. (*) $p \leq 0.03$, (†) $p < 0.008$. doi:10.1371/journal.pone.0038906.g003

both glucose and ATP affinities modified. Our results concord with the finding that other mutations in the same helix (p.Leu309Pro and p.Arg308Trp) increased thermal inactivation and/or modified glucose affinity [16,17]. Taken together, these results suggest that the $\alpha 8$ helix plays a role in the regulation of substrate affinity and protein stability. Mutation p.Arg392Ser is located in the protein periphery and, like the neighboring mutation p.Arg397Leu [17], it only slightly affected GCK activity. Thus, our mutants reduced the enzyme's catalytic activity by altering one or more kinetic parameters. Moreover, all mutants, except GCK-Glu70Asp, displayed thermal instability, which has been implicated in hyperglycemia in MODY2 patients [17,18]. Nevertheless, additional defects caused by these mutations on other mechanisms of GCK control, such as post-translational regulation, interaction with other protein partners or organelles, cannot be excluded. Globally our evaluation of enzyme activity indicates that all seven mutants play a pathogenic role in MODY2 insurgence. In addition although altered glucose and ATP binding, and thermal stability appear to be the major causes of the disease, in a few cases mutations

affected cooperativity and molecular motions, and hence impaired enzyme activity.

Although the *in vitro* functional evaluation of a GCK-mutant is a useful method with which to predict the effect exerted by a DNA change on enzyme activity, it is not a practical approach to the diagnosis of MODY. In our experience, taking into account all the experimental data concerning the seven mutants expressed, we found that the mutations induced structural alterations predicted by modeling that were in good agreement with kinetics/thermostability analyses. Therefore, this approach could be a reliable surrogate to predict the pathogenic role of a GCK variant.

In conclusion, in this five-year update of GCK mutations in MODY2 children from southern Italy, we have identified six new GCK variants thereby expanding the MODY2 mutation panel. Furthermore, our study, carried out by integrating DHPLC, sequencing, bioinformatics and functional analysis, provides new information about the structure-function relationship of human glucokinase mutations and MODY2.

Materials and Methods

Ethics Approval

The study was conducted according to the Helsinki II declaration and it was approved by the Ethics Committee of the School of Medicine Federico II, Naples, Italy.

Written informed consent to the study was obtained from each adult subject and from both parents of children.

Subjects

Between 2006 and 2010, 720 hyperglycemic children were monitored at the Departments of Pediatrics of the University of Naples “Federico II” and of the Second University of Naples, Italy. Sixty-six patients (mean age 109 months, 53% girls) who had fasting hyperglycemia (>5.5 mmol/L), HbA1c $<7.0\%$ and a family history of diabetes for at least two consecutive generations were enrolled in the study as suspected MODY2 individuals. The autoimmune markers of type-1 diabetes (glutamate decarboxylase, protein tyrosine phosphatase-like protein and insulin antibodies) were evaluated; the presence of more than one antibody was considered an exclusion criterion. One hundred unrelated euglycemic controls (mean age 363 months, 69% girls) were recruited at CEINGE (Advanced Biotechnologies, s.c.a.r.l. Naples) also between 2006–2010.

Patients, their mother and father, and controls provided 2 blood samples for biochemical testing and for DNA extraction. BMIz-score (Center for Disease Control normative, <http://www.cdc.gov>), family history of diabetes and/or other diseases, birth weight and age at admission were recorded for each patient. FPG, triglycerides (evaluated with routine methods) and HbA1c measure with HPLC (HLC-723 G7 TOSOH Bioscience Tokyo, Japan) were evaluated in each suspected MODY2 child. Genomic DNA from patients, their mother and father, and controls was extracted with the Nucleon BACC 2 kit (Amersham Biosciences Europe, Milan, Italy).

GCK Gene Analysis

The 10 exons, including their flanking intronic regions, of the GCK gene were amplified using primers and PCR conditions described elsewhere [11]. The amplified fragments were denatured at 95°C for 10 min and then renatured for 10 min to generate heteroduplexes. Each fragment was run on the DHPLC WAVE DNA fragment analysis system (Transgenomic, Inc. Omaha, NE) using DHPLC conditions reported in Table S1. Any additional or abnormal peak shape observed in the chromatogram was further sequenced (ABI PRISM 3730; Biosystems Foster City, CA, USA). All sequences were analysed in comparison with the wild-type reference sequence (NM_000162, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_000162) by the ABI Seqscape software v.2.5 (Applied Biosystems). The mutations and variants were then numbered according to the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/>).

Analysis of GCK Mutations

We first evaluated each detected GCK mutation by bioinformatics (Polyphen and SIFT algorithms and Modeller programs). We also examined the enzyme function of seven mutations among the most severe found in our population in the last decade and never characterized. The mutations for the latter study mapped in the whole enzyme structure (small, large and loops connecting domains).

Bioinformatic Analysis

Two free online prediction programs, Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html), [1] were used to predict the effect of GCK mutations on the protein. The Polyphen program [19] is a tool for the prediction of the impact of an amino acid substitution on the structure of a human protein using straight forward physical and comparative considerations. The SIFT program [20] tests a query sequence and uses multiple alignment information to predict tolerated and deleterious substitutions for every position of the query sequence. SIFT is a multistep procedure that searches for similar sequences, chooses closely related sequences that may share a function similar to that of the query sequence, obtains the alignment of these chosen sequences, and calculates normalized probabilities for all possible substitutions from the alignment. Models of all mutants of GCK were generated *in silico* with the Modeller 9v8 program using the active form of the GCK crystal structure as template [2.3 Å, Brookhaven Protein Database code (PDB code) 1v4s]. The inactive super-open form (3.4 Å, PDB code 1v4t) was also considered for comparison.

After alignment with using BODIL [21], the query and template sequences were used as input in the Modeller program [22] and 20 models were generated. The most abundant conformers of the replaced residue were selected and a simulated annealing procedure was carried out to optimize side chain conformations. The model that presented the best Modeller Discrete Optimized Protein Energy (DOPE) score was selected to be used in subsequent analyses. The initial models of selected mutants were energy minimized with the GRONingen MACHine for Chemical Simulations (GROMACS) package using the GRONingen MOlecular Simulation (GROMOS) 43a1 force field, to regularize the protein structure geometry. The molecules were solvated in boxes containing simple point charge water molecules. The energy minimization was obtained by 1000 steps of the steepest descent method and subsequently by 1000 steps of the conjugate gradient method. The notation used for secondary structure was taken from Kamata et al. [8].

Production of Recombinant Wild-type and Mutant Glutathionyl-S-transferase-glucokinase (GST-GCK)

Recombinant human wild-type beta cell GCK fused to GST (GST-GCK) was prepared as described previously [23]. Mutations were introduced into the GST-GCK construct by PCR using the QuikChange® II Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA); the oligonucleotides are reported in Table S2. Mutant constructs were checked by sequencing and digestion with specific restriction enzymes (Table S2). Fusion proteins from *E. coli* were expressed and purified as described previously [24]. Fusion proteins were stored at a concentration of about 1 mg/ml at -80°C in 30% glycerol, 50 mM glucose, 10 mM glutathione, 5 mM DTT, 200 mM KCl and 50 mM Tris/HCl, pH = 8.0. Protein concentrations were determined with the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, GmbH München Germany), and bovine serum albumin as standard. GST-GCK purification was verified by Coomassie-stained SDS-PAGE as a single band of 75 kDa.

Enzymatic Assay

GCK activity was measured spectrophotometrically on a UVIKONxl spectrophotometer (Secoman, France), using a NADP⁺-coupled assay with glucose-6-phosphate dehydrogenase. Determination of kinetic parameters and thermal inactivation were performed as previously described [23]. The K_m for ATP was measured at a glucose concentration near the relative $S_{0.5}$

values (7, 15, 8.5, 100, 20, 5 and 11 mM respectively for wild type, p.Glu70Asp, p.His137Asp, p.Phe150Tyr, p.Val154Leu, p.Gly162Asp, p.Arg303Trp and p.Arg392Ser). Thermal inactivation experiments were assayed at a glucose concentration of 100 mM. Results are reported as means \pm standard error of the mean (SEM) of three independent enzyme preparations assayed at least in duplicate.

Statistical Analysis

Variables are reported as mean \pm SD (continuous variables) or mean \pm SEM (categorical variables). We used the Student *t* test to compare variables; significance was set at $p < 0.05$. The SPSS statistical software was used.

Supporting Information

Figure S1 Close-up view of the p.Lys420Glu mutation at the inter-domain interface. The small and large domains are drawn in cyan and red, respectively. Helix 13 is shown in orange. Lys420 (red stick) forms a salt-bridge with Glu440 (yellow stick) which is located in a loop connecting the two domains. (DOCX)

References

- Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT, European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) MODY group (2008) Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 51: 546–553.
- Inciani M, Cambuli VM, Cavalot F, Congiu T, Paderi M, et al. (2010) Clinical application of best practice guidelines for the genetic diagnosis of MODY2 and MODY3. *Diabet Med* 27: 1331–1333.
- Naylor R and Philipson LH (2011) Who should have genetic testing for MODY? *Clin Endocrinol (Oxf)* 75: 422–426.
- Nyunt O, Wu JY, McGown IN, Harris M, Huynh T, et al. (2009) Investigating maturity onset diabetes of the young. *Clin Biochem Rev* 30: 67–74.
- lynedjian PB (2009) Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci* 66: 27–42.
- Massa ML, Gagliardino JJ, Francini F (2011) Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity. *IUBMB Life* 63: 1–6.
- Hussain K (2010) Mutations in pancreatic β -cell Glucokinase as a cause of hyperinsulinaemic hypoglycaemia and neonatal diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab. Disord* 11: 179–183.
- Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y (2004) Structural Basis for Allosteric Regulation of the Monomeric Allosteric Enzyme Human Glucokinase. *Structure* 12: 429–438.
- Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanné-Chantelot C, et al. (2009) Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat* 30: 1512–1526.
- Colom C, Corcoy R (2010) Maturity onset diabetes of the young and pregnancy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24: 605–615.
- Tinto N, Zagari A, Capuano M, De Simone A, Capobianco V, et al. (2008) Glucokinase gene mutations: structural and genotype-phenotype analyses in MODY children from South Italy. *PLoS One* 3: e1870.
- Mantovani V, Salardi S, Cerreta V, Bastia D, Cenci M, et al. (2003) Identification of eight novel glucokinase mutations in Italian children with maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat* 22: 338.
- Pruhova S, Dusatkova P, Sumnik Z, Kolouskova S, Pedersen O, et al. (2010) Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations. *Pediatr Diabetes* 11: 529–535.
- Burke CV, Buettger CW, Davis EA, McClane SJ, Matschinsky FM, et al. (1999) Cell-biological assessment of human glucokinase mutants causing maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2) or glucokinase-linked hyperinsulinaemia (GK-HI). *Biochem J* 342: 345–352.
- Davis EA, Cuesta-Muñoz A, Raoul M, Buettger C, Sweet I, et al. (1999) Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and hyperglycaemia syndromes and their analysis illuminates fundamental quantitative concepts of glucose homeostasis. *Diabetologia* 42: 1175–1186.
- Gidh-Jain M, Takeda J, Xu LZ, Lange AJ, Vionnet N, et al. (1993) Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1932–1936.
- García-Herrero CM, Galán M, Vincent O, Flández B, Gargallo M, et al. (2007) Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia* 50: 325–333.
- Kesavan P, Wang L, Davis E, Cuesta A, Sweet I, et al. (1997) Structural instability of mutant beta-cell glucokinase: implications for the molecular pathogenesis of maturity-onset diabetes of the young (type-2). *Biochem J* 322: 57–63.
- Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, Parhar RS, Al-Mohanna FA, et al. (2011) Mutation prediction by PolyPhen or functional assay, a detailed comparison of CYP27B1 missense mutations. *Endocrine* 40: 14–20.
- Ng PC, Henikoff S (2003) SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31: 3812–3814.
- Lehtonen JV, Still DJ, Rantanen VV, Ekholm J, Björklund D, et al. (2004) BODIL: a molecular modeling environment for structure-function analysis and drug design. *J Comput Aided Mol Des* 18: 401–419.
- Eswar N, Marti-Renom MA, Webb B, Madhusudhan MS, Eramian D, et al. (2006) Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons Inc. Supplement 15 5.6.1–5.6.30.
- Galán M, Vincent O, Roncero I, Azriel S, Boix-Pallares P, et al. (2006) Effects of novel maturity-onset diabetes of the young (MODY)-associated mutations on glucokinase activity and protein stability. *Biochem J* 393: 389–396.
- Liang Y, Kesavan P, Wang LQ, Niswender K, Tanizawa Y, et al. (1995) Variable effects of maturity-onset-diabetes-of-youth (MODY)-associated glucokinase mutations on substrate interactions and stability of the enzyme. *Biochem J* 309: 167–173.
- Weng J, Ekelund M, Lehto M, Li H, Ekberg G, et al. (2002) Screening for MODY mutations, GAD antibodies, and type 1 diabetes-associated HLA genotypes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 25: 68–71.
- Stoffel M, Froguel PH, Takeda J, Zouali H, Vionnet N, et al. (1992) Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7698–7702.
- Lorini R, Klersy C, d'Annunzio G, Massa O, Minuto N, et al. (2009) Maturity-onset diabetes of the young in children with incidental hyperglycemia: a multicenter Italian study of 172 families. *Diabetes Care* 32: 1864–1866.
- Matyka KA, Beards F, Appleton M, Ellard S, Hattersley A, et al. (1998) Genetic testing for maturity onset diabetes of the young in childhood hyperglycaemia. *Arch Dis Child* 78: 552–554.
- Estalola I, Rica I, Perez de Nancrales G, Bilbao JR, Vazquez JA, et al. (2007) Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clin Endocrinol Oxf* 67: 538–546.
- Shimada F, Makino H, Hashimoto N, Taira M, Seino S, et al. (1993) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus associated with a mutation of the glucokinase gene in a Japanese family. *Diabetologia* 36: 433–437.
- Massa O, Meschi F, Cuesta-Munoz A, Caumo A, Cerutti F, et al. (2001) High prevalence of glucokinase mutations in Italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity and BMI. *Diabetologia* 44: 898–905.

Table S1 DHPLC conditions to detect GCK variants. (DOCX)

Table S2 Primers used for site-directed mutagenesis in GCK cDNA. (DOCX)

Acknowledgments

We thank our diabetic patients and their families for their kind cooperation in this study.

Writing assistance: Jean Ann Gilder (Scientific Communication srl) provided writing assistance.

Provenance and peer review: Not commissioned; externally peer reviewed.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LS. Performed the experiments: MC CMGH. Analyzed the data: LS MC CMGH NT MAN AZ. Contributed reagents/materials/analysis tools: DI AF CC IC VC AC. Wrote the paper: LS MC NT AZ MAN.

